

**A Hsp27 neuroprotektív szerepének tanulmányozása
transzgenikus egerekben**

Ph.D. értekezés

Tóth Erzsébet Melinda

Témavezető: Dr. Sántha Miklós

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézet

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

2012

Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	1
BEVEZETÉS	2
A hősokkfehérjék	2
A hősokkfehérjék termelődésének szabályozása	3
A kismolsúlyú hősokkfehérjék.....	4
Az Alzheimer-kór	5
Stresszfehérjék szerepe neurodegeneratív betegségekben	6
Etanol és stresszfehérjék	7
CÉLKITŰZÉSEK.....	10
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	11
Plazmid konstrukció előállítása	11
Transzgenikus egérvonalak előállítása pronucleus mikroinjekcióval.....	11
DNS tisztítása egér szövetmintából	11
Egér szövetminták PCR analízise	12
Fehérje tisztítása egér szövetmintából	12
Western blot analízis	12
Immunhisztokémia.....	13
Etanol kezelés	13
Magatartás tesztek.....	13
Lépés-mintázat (Footprint) analízis.....	14
Egyensúlyozás (Balance beam) teszt	14
Fordított rács (Inverted screen) teszt	14
Fluoro-JadeC festés.....	14
Az APP ^{swe} /PS1 ^{dE9} /Hsp27 genotípusú transzgenikus egértörzs előállítása	15
Magatartás tesztek.....	15

Open field teszt.....	15
Barnes-féle labirintus (Barnes maze)	16
Morris-féle vízilabirintus (Morris Water Maze)	16
Immunhisztokémia.....	17
Idegsejt elhalás kimutatása Fluoro-JadeC festéssel	17
Elektrofiziológiai mérések hippocampusz szeleteken	18
Statisztikai analízis.....	18
EREDMÉNYEK.....	19
Transzgenikus egerek előállítása	19
A transzgén kifejeződésének vizsgálata	20
Akut etanol kezelés hatásának vizsgálata	21
Lépés-mintázat (Footprint) analízis.....	22
Egyensúlyozás (Balance beam) teszt	23
Fordított rács (Inverted screen) teszt	25
Hsp27 neuroprotektív szerepének vizsgálata krónikus etanol kezelés alatt	25
Hsp27 neuroprotektív szerepének vizsgálata Alzheimer-kórban.....	29
Magatartás tesztek	29
Open field teszt.....	29
Barnes-féle labirintus teszt (Barnes-maze).....	29
Morris-féle vízi labirintus teszt (Morris water-maze)	31
Amiloid -plakkok kimutatása	32
Elektrofiziológias vizsgálatok	33
Az idegsejtek pusztulásának vizsgálata.....	35
DISZKUSSZIÓ.....	37
A Hsp27 védő hatása etanol kezeléssel szemben.....	38
A Hsp27 szerepe az Alzheimer-kór szerű tünetek kialakulásának lassításában ..	40
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	44

IRODALOMJEGYZÉK	45
A DOLGOZAT ÖSSZEFOGLALÁSA.....	54
Bevezetés	54
Célkitűzések	55
Eredmények	55
Eredmények megvitatása	55
SUMMARY OF THE THESIS	58
Introduction	58
Aim of the study.....	59
Results	59
Discussion	60
KÖZLEMÉNYEK	62

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AD	Alzheimer kór (Alzheimer disease)
APP	Amiloid prekursor protein (Amyloid precursor protein)
A β	β -amiloid (Amyloid beta)
fEPSP	Mező-serkentő posztzinaptikus potenciál (Field excitatory postsynaptic potencial)
CMV	Cytomegalovírus
GGA	Geranil-geranil aceton
HSE	Hősokk faktor kötő elem (Heat shock element)
HSF	Hősokk faktor (Heat shock factor)
Hsp	Hősokkfehérje (Heat shock protein)
LTP	Hosszú távú potenciáció (Long term potentiation)
PPF	Páros impulzus facilitáció (Paired pulse facilitation)
Psen1	Presenilin1
ROS	Reaktív oxigén gyök (Reactive oxygen species)
SOD	Szuperoxid-dizmutáz (Superoxide dismutase)

BEVEZETÉS

A Hsp27 a kismolsúlyú hősokkfehérjék családjának egyik legtöbbet tanulmányozott, legjobban ismert tagja. A stresszfehérjék egyik fő feladata, azon túl, hogy a sejt nyugalmi állapotában is létfontosságú szerepet töltenek be, a sejtek védelme stressz körülmények között. Az élő sejtek számára stressz hatás minden hirtelen megváltozott körülmény, például magas hőmérséklet, hipoxia, de ide tartozik az etanol kezelés, illetve különböző betegségek, köztük neurodegeneratív elváltozások is. Megfigyelték, hogy neurodegeneratív betegségek során megnő a hősokkfehérjék expressziója az agyban, illetve több tanulmány szerint különböző stresszfehérjék védő hatással rendelkeznek egyes idegrendszeri betegségek tüneteivel szemben, például az Alzheimer-kórban is. Az Alzheimer-kór korunk egyik leggyakoribb neurodegeneratív betegsége, mely az idősödő népességet egyre nagyobb számban érinti. Habár nagyon sok tanulmány foglalkozik az Alzheimer-kór patomechanizmusának felderítésével, illetve különböző gyógymódok kifejlesztésével, a betegség kialakulásának egyes lépései még ma sem teljesen tisztázottak. A stresszfehérjék funkciójuknál fogva ígéretes célpontok lehetnek különböző neurodegeneratív betegségek kialakulását gátló, tüneteiket enyhítő szerek kifejlesztése során. Hogy nagyobb betekintést nyerhessünk a kismolsúlyú hősokkfehérjék által kifejtett neuroprotektív hatások mechanizmusába, csoportunkban a Hsp27 szerepét vizsgáltuk két különböző idegrendszert károsító folyamattal szemben, egyrészt az Alzheimer-kór tüneteinek kialakulása során, másrészt akut illetve krónikus etanol kezelés alatt.

A hősokkfehérjék

A stresszfehérjék, másnéven hősokkfehérjék az élővilágban általánosan elterjedt, evolúciósan konzervált fehérjék, melyek az úgynevezett *chaperon* fehérjék családjába tartoznak. 1962-ben Ritossa figyelte meg, hogy hőkezelés hatására a *Drosophyla* óriáskromoszómáján kromoszóma-kitüremkedések jelennek meg. Ezek után számos fehérjét fedeztek fel, amelyek magas hőmérséklet hatására indukálódnak, ezért hősokkfehérjéknek nevezték el őket. A későbbiekben megfigyelték, hogy nem csak hő hatására, de egyéb stressz hatásokra is megemelkedik ezen fehérjék expressziója, így ma már a stresszfehérje elnevezés is használatos. A legkülönbözőbb stressz hatások aktiválhatják a hősokkfehérjéket, például hipoxia, ischemia, nehézfém vagy etanol kezelés, de fertőzések során és egyéb különböző betegségekben is megnőhet az expressziójuk. Stressz hatására nagyon gyorsan

indukálódnak, hiszen egyik legfontosabb feladatuk a sejtek védelme stressz körülmények között. A prekondicionálás jelensége is a hősokkfehérjékhez kapcsolódik. Ennek lényege, hogy egy enyhébb stressz hatására védelem alakul ki egy azt követő, erősebb károsodással szemben. A jelenség magyarázata, hogy az enyhe stressz hatására megemelkedhet a hősokkfehérjék termelődésének mértéke, ami a későbbiekben védelmet biztosít az amúgy letális stressz hatásokkal szemben is (Li és Werb, 1982).

A legtöbb stresszfehérje a sejt nyugalmi állapotában is létfontosságú szerepet tölt be. Molekuláris chaperonként, ún. dajkafehérjeként is funkcionálnak, amelyeknek fontos szerepük van a fehérjék bioszintézise és szerkezetük kialakítása során, valamint a különböző sejt szervecskék közötti szállításuk közben (Morimoto és mtsai. 1992). A *chaperonok* definíció szerint olyan nem rokon, celluláris fehérjék, amelyek segítenek más fehérjék helyes konformációjának kialakításában, de nem képezik részét a végső struktúrának (Ellis, 1990). Olyan fehérjemonomereket is stabilizálnak, amelyek később fognak összekapcsolódni, mint például az aktin monomerek (Sun és mtsai. 1995). Az elromlott szerkezetű vagy rosszul feltekeredett fehérjéket a sejt lebontóapparátusához irányítják. Nem stressz körülmények között egyéb sejt folyamatok szabályozásában is részt vesznek, például fehérjék lebontásában, antigén prezentációban, jelátviteli folyamatokban, vezikulák fúziójában. Ezenkívül a stresszfehérjék részt vesznek a sejtek normál homeosztázisának és metabolismusának szabályozásában is.

A sejtet ért különböző stressz hatására megváltozhat a fehérjék konformációja. Ha a sejtet stressz éri, a hősokkfehérjék segítenek megelőzni a fehérjék szerkezetének megváltozását, megakadályozzák, hogy ezek a hibás szerkezetű fehérjék egymással aggregálódjanak, illetve részt vehetnek a menthetetlenül károsodott fehérjék proteozómákhoz történő továbbításában is (Becker és Craig, 1994). A hősokkfehérjék a membrán működésében és védelmében is szerepet játszanak (Horvath és mtsai. 2008). Ezenkívül a stresszfehérjék apoptózist gátló hatását is megfigyelték, például a Hsp70 stresszkinázokat (Gabai és mtsai. 1998), a kismolsúlyú hősokkfehérjék kaszpázokat gátolnak (Garrido és mtsai. 1999).

A hősokkfehérjék termelődésének szabályozása

A stresszfehérjék expressziójának szabályozása speciális transzkripciós faktorok, az úgynevezett hősokk faktorok (HSF) aktiválódásán keresztül történik. Élesztőben a HSF nem stressz körülmények között is DNS-hez kötött, hőkezelés hatására azonban foszforilálódik, aminek hatására megnő a transzkripció aktivitása (Jacobsen és Pelham 1998). Magasabb

rendű eukariótákban alapállapotban a HSF egy DNS-hez nem kapcsolódó monomer formájában van jelen a sejtek citoplazmájában, majd stressz hatására trimerizálódik, ezután a sejtmagba vándorolva ott hozzákötődik a stresszfehérjék promóter régiójában található hősokk faktor kötő elemekhez (HSE). A folyamat nagyon gyorsan lezajlik, a hősokkfaktor DNS-kötő formája pár perccel a hőkezelést követően már kimutatható (Morimoto 1992). Gerincesekben eddig öt féle hősokkfaktort írtak le. A HSF-1 a legfőbb és legtöbbet tanulmányozott hősokkfaktor, ami különböző stressz hatásokra aktiválódik, és többféle hősokkfehérje termelődését is szabályozza. A HSF-2 főként a fejlődés korai szakaszában és a differenciálódás során működik, habár már kimutatták, hogy heterokomplexet képezve a HSF-1-gyel fokozza annak hatását a Hsp70 aktiválása során (He és mtsai. 2003). Az egér HSF-3-mal kapcsolatban megfigyelték, hogy hősokk hatására a sejtmagba transzportálódik, de nem aktiválja a klasszikus hősokk géneket (Fujimoto és mtsai. 2010). A HSF-4 többféle sejtre jellemző (Tanabe és mtsai. 1999), de előfordulása a szemlencsében a legdominánsabb (Somasundaram és Bhat 2000).

A kismolsúlyú hősokkfehérjék

A hősokkfehérjéket általában molekulatömegük szerint csoportosítják. Az emlős stresszfehérjéknek öt nagy családját különböztetjük meg: a Hsp100, Hsp90, Hsp70 és Hsp60 családot valamint a kismolsúlyú hősokkfehérjék családját. A 27 kDa nagyságú Hsp27 a kismolsúlyú hősokkfehérjék családjába tartozó fehérje. Habár a stresszfehérjék meglehetősen konzerváltak, kismértékben különbözhetnek az egyes fajokban, így például az emberben és patkányban megtalálható Hsp27-nek az egérben egy 25 kDa-os izoformája található meg, amit ennek megfelelően Hsp25-nek neveztek el. A kismolsúlyú hősokkfehérjék 16-40 kDa molekula tömegűek, és mindegyikükben megtalálható egy 100 aminosavas konzervált C-terminális domén, az úgynevezett α -crystallin domén (de Jong és mtsai. 1998). A kismolsúlyú hősokkfehérjékre jellemző, hogy különböző nagyságú, akár 700 kDa-os komplexeket alkothatnak (Beck és mtsai. 2000). Ismeretes, hogy a kismolsúlyú hősokkfehérjék különböző poszt-transzlációs módosításokon is áteshetnek, ezek közül a leggyakoribb a szerin oldalláncok foszforilációja. Több kismolsúlyú hősokkfehérje folyamatosan termelődik különböző szövetekben, de expressziójuk szintje megemelkedik stressz hatásokra, és egyes betegségek során (Kappe és mtsai. 2003). A kismolsúlyú hősokkfehérjék ATP független chaperonok. A Hsp27 egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy képes hozzákötődni a hibás szerkezetű, instabil fehérjékhez, ezáltal megakadályozza, hogy azok egymással kapcsolódva aggregátumokat képezzenek, ezzel együtt biztosítja annak lehetőségét, hogy térszerkezetük a

későbbiekben helyreálljon. A kismolsúlyú hősokkfehérjék ugyan önmagukban nem tudják kijavítani a szerkezeti hibákat, de továbbítani tudják a hibás fehérjéket az ATP függő chaperonoknak, például a Hsp70 család tagjainak, amelyek feladata többek között a hibás, sérült szerkezetű fehérjék helyreállítása. A kismolsúlyú hősokkfehérjéknek ezen kívül anti-apoptotikus és oxidatív stresszt gátló tulajdonságai is vannak, valamint a sejtvázhoz is kapcsolódva stabilizálhatják azt.

Az Alzheimer-kór

Az Alzheimer-kór (AD, Alzheimer's disease) az egyik leggyakoribb neurodegeneratív betegség, előfordulásának valószínűsége az életkorral arányosan nő (Evans és mtsai. 1989). Jellemző tünetei a memória és a kognitív funkciók folyamatos romlása (McKhann és mtsai. 1984). A kór patológiai jellemzői az amiloid-plakkok képződése, a neurofibrilláris kötegek kialakulása, a mikroglia aktiváció, a szabadgyökök keletkezése, a lipid peroxidáció, a neuronális metabolikus homeosztázis felborulása és végül az idegsejtek pusztulása (Serrano-Pozo és mtsai. 2011, Monji és mtsai. 2001). A plakkok és neurofibrilláris kötegek kialakulása leginkább azokra az agyterületekre jellemző, amelyek a tanulásban, a memória és a viselkedés szabályozásában játszanak szerepet, mint például az entorinális kéreg, hippocampusz, bazális előagy és az amygdala (Walsh és mtsai. 2002). A plakkok fő alkotóelemei a β -amiloid peptidek ($A\beta$), például $A\beta$ -40 és $A\beta$ -42 (Hardy és Selkoe, 2002, Mattson, 2004). Az $A\beta$ egy 4 kDa nagyságú polipeptid (Glennner és Wong, 1984), ami az amiloid prekursor proteinből (APP) keletkezik a β - és γ -szekretázok proteolitikus hasítása által (Hardy és Selkoe, 2002, Mattson, 2004). Az $A\beta$ peptidek egymással aggregálódhatnak, így oligomerek, protofibrillumok, érett fibrillumok alakulhatnak ki (Walsh és mtsai. 1999). Az $A\beta$ aggregációja különböző útvonalakon keresztül okozhatja az idegsejtek pusztulását. Feltételezhető, hogy a neurodegeneráció részben az amiloid lerakódás miatt kialakuló krónikus gyulladásos folyamatok következménye (Akiyama és mtsai. 2000, Wyss-Coray és Mucke 2002). Ezenkívül az $A\beta$ aggregátumok különböző formái direkt neurotoxikus hatással is rendelkezhetnek (Glabe 2005, Kaye és mtsai. 2003). A legújabb eredmények szerint inkább a kevésbé aggregált formák, mint például az oligomerek és protofibrillumok rendelkeznek neurotoxikus hatással, és nem a nagyobb aggregátumok (Haass és Selkoe, 2007). Megfigyelték például, hogy az $A\beta$ szolubilis formája toxikusabb a cerebrovaszkuláris simaizom sejt kultúrákra nézve, mint az aggregált fibrillumok (Davis-Salinas és Van Nostrand, 1995). Több tanulmány is kimutatta, hogy a szolubilis amiloid oligomerek megváltoztathatják a szinaptikus működést (Walsh és mtsai. 2002, Lesné és mtsai. 2006). Más eredmények

szerint az APP-t túltermelő transzgenikus egerekben intracelluláris amiloid aggregátumok alakulnak ki még a plakkok megjelenése előtt. Ezek az intracelluláris aggregátumok a szinapszisokban halmozódnak fel, és összefüggésben állhatnak a kognitív képességek romlásával, valamint hozzájárulhatnak az idegsejtek pusztulásához (Oddo és mtsai. 2003, Billings és mtsai. 2005). Bizonyos, hogy a β -amiloid központi szerepet játszik az Alzheimer-kór tüneteinek kialakulásában, így a sejtek azon elemei, amelyek részt vesznek az amiloid termelődésében, lebontásában vagy oligomerizációjában, jó célpontok lehetnek olyan hatóanyagok kifejlesztésében, amelyek az Alzheimer-kór megelőzését célozzák.

Stresszfehérjék szerepe neurodegeneratív betegségekben

Az idősödő szervezetben a felborult homeosztázis miatt megnő a megváltozott, hibás szerkezetű fehérjék mennyisége. A helyzetet tovább súlyosbítja, hogy a hibajavító, lebontó mechanizmusok sem működnek tökéletesen, így a hibás fehérjék tovább halmozódnak, ami a csökkent mennyiségű működőképes chaperonok túltelítődéséhez vezet. Ezek a folyamatok aztán elősegíthetik a fehérjeaggregátumok felhalmozódását az idősödő szervezetben, ami ha az agyban történik, neurodegeneratív betegségek kialakulásához vezethet (Sóti és Csermely, 2003). Ezért nem meglepő, hogy a stresszfehérjék túltermelése segítheti e betegségek tüneteit csökkenteni.

Megfigyelték, hogy a plakkok az amiloidon kívül különböző egyéb fehérjéket is tartalmaznak, például kismolsúlyú hősokkfehérjéket, amelyek befolyásolhatják az A β biológiai funkcióit (Sun és MacRae, 2005). Több tanulmány szerint a stresszfehérjéknek szerepük lehet különböző neurodegeneratív betegségek megelőzésében, nemcsak Alzheimer-kór esetén, de egyéb rendellenességekben is, amelyekre fehérje aggregáció jellemző. Például a Hsp70 a motoneuron betegség modelljében, vagy a Hsp104 a Parkinson-kór modelljében megakadályozta a fehérjék aggregációját, valamint csökkentette a betegségekre jellemző tüneteket (Katsuno és mtsai. 2005, Lo Bianco és mtsai. 2008). Több esetben kimutatták, hogy az Alzheimer-kórban szenvedő betegek agyában megnövekedett a különböző hősokkfehérjék expressziója (Perez és mtsai. 1991, Muchowski és Wacker, 2005). Számtalan *in vitro* eredmény azt sugallja, hogy a stresszfehérjék, különösen a Hsp70 gátolhatja az Alzheimer-kór kialakulását (Magrane' és mtsai. 2004, Evans és mtsai. 2006). Hoshino és munkatársai (2011) egy, az APP mutáns formáját túltermelő egértörzsön vizsgálták a Hsp70 hatását. Azt tapasztalták, hogy a Hsp70 hatására csökkentek az Alzheimer-kór patológiai tünetei, és ezzel párhuzamosan javultak a kognitív képességek.

A stresszfehérjék termelődése fokozódik különböző neurodegeneratív betegségekben, így védve meg az idegsejteket az oxidatív stressz, a szabadgyökök és a rendellenes szerkezetű fehérjék okozta károsodásoktól (Kalmar és Greensmith, 2009). Az Alzheimer-kórban a hősokkfehérjék az amiloid plakkokhoz és a neurofibrilláris kötegekhez kapcsolódva mutathatók ki, és több tanulmány szerint a stresszfehérjék képesek megakadályozni az A β akkumulációját (Abdul és mtsai. 2006, Evans és mtsai. 2006, Shimura és mtsai. 2004). Wilhelms és mtsai. (2006) kimutatták, hogy a kismólsúlyú hősokkfehérjék családjába tartozó Hsp20, Hsp27 és α B-crystallin erősen kötődnek az A β peptidhez, és megakadályozzák annak aggregációját. Ezenkívül gátolják az A β toxicitását, valószínűleg azért, hogy csökkentik az A β felhalmozódását a sejtek felszínén.

Etanol és stresszfehérjék

Az alkoholfogyasztás gyakorlatilag az összes szervre hatással van, közöttük az agy működésére is. Az etanol számos citotoxikus hatással rendelkezik, melyek nagy része sejttípustól független (Baker és Kremer, 1999). Az etanol többek között befolyásolja a membrán lipidek állapotát, denaturálja a fehérjéket, hatására megemelkedik a reaktív oxigén gyökök termelődése, ami lipidperoxidációhoz vezethet. Több tanulmány szerint krónikus etanol fogyasztás hatására megváltozik a membránok fehérje összetétele különböző szövetekben, többek között az agykéregben (Babu és Vemuri 1990, Babu és mtsai. 1990). Ez a változás is hozzájárulhat a membrán stabilitásának romlásához. Valószínű, hogy az etanol az agyban elsődlegesen az idegsejtek membránján fejt ki hatását (Goldstein és Chin 1981). Egyrészt közvetlenül is kapcsolódhat membránfehérjékhez, így megváltoztatva azok konformációját, ami aztán a fehérjefunkció megváltozásához vezet (Fadda és Rossetti 1998). Ezen kívül számos tanulmány bizonyítja, hogy az etanol hatására csökken a membrán rendezettsége, nő a fluiditása, ami viszont hatással lehet a különböző receptorok és ioncsatornák működésére, így befolyásolhatja az egyes jelátviteli folyamatokat az agyban. Etanol kezelés hatására a reaktív oxigén gyökök (ROS) termelődése is megnövekszik, melyek ezután kölcsönhatásba léphetnek a membrán lipidekkel és fehérjékkel. A plazma membránban található zsírsavak oxidációja jelentős változásokat okoz a membrán szerkezetében, ami akár a sejtek pusztulásához is vezethet (Mason és mtsai. 1997). Ezen kívül a szabadgyökök a fehérjéket is károsíthatják, ami aggregátumok kialakulásához, vagy az enzimaktivitás elvesztéséhez vezethet. Sergent és mtsai. (2005) munkáiból az is kiderül, hogy a membránok fluiditásának növekedése is összefüggésben áll a megnövekedett ROS termelődéssel. Valószínűleg az etanol kezelést követő erősödő ROS termelés hozzájárul a membrán

szerkezetének megváltozásához, ami azután az oxidatív stressz további erősödéséhez, végül a sejtek pusztulásához vezet.

A fentiekből kiderül, hogy az etanol egy sor citotoxikus hatással rendelkezik, melyek végül a sejtek pusztulását okozzák. Ugyanakkor az akut vagy krónikus etanol kezelés, hasonlóan más káros hatásokhoz, stresszválaszt vált ki, aktiválja a hősokkfaktorokat, ezáltal a hősokkfehérjék termelődését. Több adat utal arra, hogy a stresszfehérjék termelődése megvédi a sejteket az etanol citotoxikus hatásaitól. Yeo és mtsai. (2008) a ginzeng védő hatását vizsgálták etanol által kiváltott gyomor léziókban. Azt tapasztalták, hogy az etanol kezelés előtt alkalmazott ginzeng kezeléssel megelőzhető a léziók kialakulása, és csökken az apoptotikus sejtek száma a gyomor nyálkahártyában. Ugyanakkor a ginzeng kezelés hatására megemelkedett a Hsp27 és Hsp70 szintje, amiből arra következtethetünk, hogy a ginzeng védő hatása legalább részben ennek köszönhető. A geranil-geranil aceton (GGA), egy fekély elleni gyógyszer, ami szintén megnöveli a hősokkfehérjék expresszióját. Mizushima és mtsai. (1999) kísérleteik során azt tapasztalták, hogy a GGA-t gyomor nyálkahártya sejtekhez adva megvédi azokat az etanol kezelés által kiváltott apoptózis ellen.

A hősokk és az etanol kezelés által kiváltott stresszválasz több hasonlóságot mutat (Piper és mtsai. 1995). Mindkét hatás károsítja a membránt, denaturálja a fehérjéket, és hasonló változásokat okoznak a membrán fehérjeösszetételében. Mivel hasonló károsodásokat okoznak, feltételezhető, hogy a stresszfehérjék etanol kezelés során is védelmet biztosítanak. Több tanulmány kimutatta, hogy az etanolkezelés hatására indukálódott hősokkfehérjék kapcsolatban állnak a megnövekedett alkohol tolerancia kialakulásával baktériumokban (Jobin és mtsai. 1997, Mantis és Winans 1992). Coucheney és mtsai. (2005) megfigyelték az *Oenococcus oeni* tejsavbaktériumban, hogy a kismolsúlyú hősokkfehérjék családjába tartozó Lo18 a membránhoz kapcsolódik hősokk, etanol vagy benzilalkohol kezelés során. Úgy tűnik, hogy a Lo18 szabályozza a membrán tulajdonságait, növeli a molekuláris rendezettségét, aminek hatására csökken a membrán fluiditása.

Több tanulmány szerint a Hsp27 és a Hsp70 túltermelése védelmet biztosíthat az oxidatív stresszel szemben. Például Mehlen és mtsai. (1996) Hsp27-et termelő sejtekben TNF- α kezelés után kisebb mértékű lipidperoxidációt és protein oxidációt tapasztaltak, ami arra utal, hogy Hsp27 hatására megnő a sejtek ellenállása az oxidatív stresszel szemben. Yamamoto és mtsai. (2000) munkájuk során azt tapasztalták, hogy a hősokkal történő prekondicionálás, ami megnövekedett Hsp70 termelődéssel jár, megvédi a máj sejteket az oxidatív stressztől. Azt is kimutatták, hogy a Hsp27 védő hatást fejt ki a szívben ischémiareperfüzió során, azáltal, hogy csökkenti az oxidatív stressz mértékét (Hollander és mtsai.

2004). E tanulmányok alapján arra következtethetünk, hogy a stresszfehérjék túlermelése az etanol kezelés által kiváltott oxidatív stresszel szemben is megvédheti a sejteket.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során arra kerestük a választ, hogy a Hsp27 fehérje rendelkezik-e neuroprotektív hatással 1) akut illetve krónikus etanol kezelés alatt, valamint 2) az Alzheimer-kór során kialakuló neurodegenerációval szemben.

Ennek érdekében a következő feladatok megvalósítását tűztük ki célul:

- 1a) Humán Hsp27 fehérjét túlteremlő transzgenikus egértörzs létrehozása.
- 1b) Transzgenikus és vad típusú egércsoportok akut etanol kezelése.
- 1c) Mozgáskoordináció és ataxia vizsgálata magatartás tesztekkel az etanol kezelést követően.
- 1d) Transzgenikus és vad típusú egércsoportok krónikus etanol kezelése.
- 1e) Ezt követően idegsejt elhalás vizsgálata Flouoro-Jade C festéssel.
- 2a) A Hsp27 transzgenikus egértörzs keresztezése az Alzheimer-kór validált állatmodelljével (APPswe/PSE1dE9).
- 2b) Tanulási folyamatok vizsgálata magatartás tesztekkel Hsp27xAD modell transzgenikus egerekben
- 2c) Amiloid plakkok festése, és mennyiségi összehasonlítása a különböző genotípusú állatokban.
- 2d) Elektrofiziológiás vizsgálatok hippocampusz szeleteken.
- 2e) Apoptózis és neurodegeneráció vizsgálata immunhisztokémiai módszerekkel.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Plazmid konstrukció előállítása

A humán Hsp27 cDNS-t tartalmazó pIRES-hHsp27 plazmidot Wilbert Boelens-től (University of Nijmegen, Hollandia) kaptuk meg. A humán Hsp27 cDNS-t a plazmidból kivágtuk, majd a virális CMV promóter mögé klónoztuk (pCMV-hHsp27). A plazmidokból a transzkripció egységet ApaLI-AdeI enzimekkel vágtuk ki, és az így keletkező 2,6 kb hosszú DNS fragmentet kitisztítottuk, és 2 ng/μl koncentrációban injektáltuk.

Transzgenikus egérvonalak előállítása pronucleus mikroinjekcióval

A hHsp27 transzgenikus állatok előállítására a hagyományos pronukleusz mikroinjekciót alkalmaztuk. Petesejt donornak az FVB egértörzset választottuk. 6-8 hetes nőstény egereket vemhes kanca szérum (PMSG-Pregnant Mares Serum Gonadotropin, Sigma), majd 48 óra múlva humán gonadotropin hormon (HCG- Human Chorion Gonadotropin, Sigma) intraperitoneális oltásával szuperovuláltattunk. A megtermékenyített petesejteket a petevezetőből izoláltuk, és a kumulus sejtektől rövid hyaluronidáz enzim kezelésével választottuk el. A petesejteket többször átmostuk M2 mediumban, és utána összegyűjtöttük. Mikroinjektálásra Hoffman optikával és kondenzorral felszerelt Nikon Eclipse TS 100 mikroszkópot és Leitz-típusú mikromanipulátort használtunk. A megtermékenyített petesejtek hím pronukleuszát 2 ng/μl linearizált, tisztított hHsp27 DNS-sel injektáltuk. A mikroinjektálás végén az ép és egészséges petesejteket izoláltuk, és CBA vazektomizált hímekkel párosított, CD1 álvemhes anyák petevezetőjébe ültettük vissza.

DNS tisztítása egér szövetmintából

A megszületett utódokból 10 napos korukban szövetmintát vettünk (farok). A szövetet 200 μl TNES (10 mM Tris, pH 7,5, 400 mM NaCl, 100 mM EDTA, 0,6% SDS) pufferben 10 μl proteináz-K (10 μg/ml) hozzáadásával emésztettük 55°C-on, egy éjszakán keresztül. A fehérjéket 55 μl 6 M-os NaCl hozzáadásával sóztuk ki, majd 10 perc centrifugálás után a felülúszót tiszta eppendorf csőbe mértük át, majd egy térfogatnyi kloroformot adtunk hozzá. 5 perc centrifugálás után a felülúszót tiszta eppendorf csőbe mértük át, és 200 μl 95%-os jéghideg etanollal kicsaptuk a DNS-t. 30 perc centrifugálás után (13000 rpm, 4°C-on) az üledéket 500 μl 70%-os etanollal mostuk át. Beszárítás után 50 μl TRIS-HCl (pH 7,2)

pufferben oldottuk vissza a mintákat 65°C-on. A DNS oldatok koncentrációját spektrofotométerrel OD 260 nm-en (Nanodrop) határoztuk meg. A DNS mintákat felhasználásig -20°C-on tároltuk.

Egér szövetminták PCR analízise

A megszületett utódokban a transzgén jelenlétét PCR reakcióval mutattuk ki. A 25 µl össztérfogatú PCR reakcióelegy 10 µl templát DNS-t, 7 µl H₂O-t, 2,5 µl 10 x PCR puffer-t, 1-1 µl forward és reverz primer-t, 2,5 µl dNTP-t és 1 µl Taq polimeráz enzimet (Fermentas) tartalmazott. A PCR reakciókhoz a következő primereket használtuk:

Hsp27 forward primer: 5'-GTC CCT GGA TGT CAA CCA CT-3'

Hsp27 reverz primer: 5'- GAC TGG GAT GGT GAT CTC GT-3'

A PCR reakciót MJ Research PTC-200 PCR gépben futtattuk, a program paraméterei a következők voltak: denaturáció: 94°C- 5 perc, denaturáció: 94°C- 40 s, annealing: 65°C- 40 s, elongáció: 72°C- 40 s, 37 ciklusban, végül 72°C- 5 perc a végek feltöltésére.

A PCR termékeket 2%-os, etídium bromidot tartalmazó agaróz gélben szeparáltuk 120 mV-on.

Fehérje tisztítása egér szövetmintából

A fagyasztott szöveteket 50 mM Tris-HCl-t (pH 8), 0,1 mM NaCl-ot, 10 mM EDTA-t és proteáz inhibitort tartalmazó lízis pufferben homogenizáltuk, majd 30 perc centrifugálás (10000 rpm, 4°C) után a felülúszót tiszta eppendorf csőbe mértük át. A fehérjeminták koncentrációját spektrofotométerrel (Nanodrop) határoztuk meg. A mintákat felhasználásig -80°C-on tároltuk.

Western blot analízis

A különböző szervekben a humán HSP27 fehérje kifejeződését először Western blot analízissel vizsgáltuk. Poliakrilamid gélre azonos mennyiségű (50 µg) fehérjemintákat vittünk fel. A gél egy 5%-os gyűjtő és egy 15%-os szeparáló részt tartalmazott. A különböző molekulatömegű fehérjéket 120 mV-os, 90 perces futtatással választottuk el. A gélen lévő fehérjemintákat ezután PVDF membránra blottoltuk (Millipore). A blottolási idő 1 óra volt 200 mA áramerősségen. A blottolás után a membránt 5% tejport tartalmazó TPBS-ben (Tween 20-1x PBS) áztattuk 1 órán keresztül. Ezután a membránt egy éjszakán át inkubáltuk az elsődleges, nyúlban termeltetett anti-humán HSP27 antitesttel (Stressgen, 1:500) illetve nyúlban termeltetett anti-aktin ellenanyaggal (Sigma 1:5000). Háromszor 10 perces mosás

(TPBS-ben) után másodlagos, anti-nyúl antitesttel (Jackson ImmunoResearch 1:50000) 30 percen át inkubáltuk a membránt. Ezt újabb 3x10 perces mosás követte. A kemilumineszcens reagenssel (Millipore) 2 percig inkubáltuk a membránt, majd röntgenfilmet tettünk rá, és 10 perc exponálás után előhívtuk.

Immunhisztokémia

A humán Hsp27 fehérje eloszlását az agyban immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk. Az agymintákból 10 µm vastagságú fagyasztott metszeteket készítettünk, melyeket acetonban fixáltuk 3 percig, majd felhasználásig -80°C-on tároltuk azokat. Közvetlenül festés előtt a metszeteket 20 percig inkubáltuk 1,5% H₂O₂-t tartalmazó metanolban, majd újabb 20 percig 3% H₂O₂-t tartalmazó metanolban az endogén peroxidázok semlegesítése érdekében. Ezt követően 3x5 percig mostuk a mintákat PBS-ben, majd 0,1 mg/ml II típusú kollagenázzal (Sigma) kezeltük őket 5 percig. Ezt újabb mosás követte, majd 1 órás inkubáció 5%-os kecske-szérumban. Ezután a metszeteket az elsődleges ellenanyaggal (anti-humán Hsp27, Stressgen, 1:100) jelöltük egy éjszakán keresztül 4°C-on. Másnap 3x5 perc mosást követően a mintákat 45 percig inkubáltuk a megfelelő másodlagos ellenanyaggal (anti-nyúl antitest, Chemicon, 1:2000). Újabb mosást követően előhívó reagenst használtunk (10% dimetil-formamid, 10% imidazol-puffer, 0,02% aminoethyl-carbazole, 0,04% H₂O₂) kb 15 percig. Ezután a sejtmagokat hematoxilinnel festettük 4 percig, majd mosás és szárítás után a metszeteket glicerines zselatinnal lefedtük.

Etanol kezelés

A Hsp27 neuroprotektív hatását akut és krónikus etanol kezelések után vizsgáltuk. A kezelésekhez négy hónapos transzgenikus (n=20) és vad típusú (n=20) állatokat használtunk. Az állatokat 2-4 fős csoportokban tartottuk sztenderd körülmények között (24°C, 12 órás világos-sötét periódus). Az akut etanol kezelés során az állatok 20%-os intaperitoneális etanol injekciót kaptak (2 g/ttkg), illetve a kontrol csoport tagjai azonos térfogatú fiziológiás sóoldatot. A krónikus etanol kezelés alatt az állatok ivóvíz helyett 10%-os etanolt kaptak 4 napig, majd 15%-osat újabb 4 napig (adaptáció), végül 5 hétig 20%-os etanolt. Az akut etanol kezelés hatását magatartás tesztekkel vizsgáltuk, a krónikus kezelés után az állatok agyából metszeteket készítettünk, majd az elhalt idegsejteket Fluoro-JadeC festés után megszámláltuk.

Magatartás tesztek

A viselkedési tesztekhez az állatokat négy csoportba osztottuk: etanol kezelt transzgenikus, illetve vad típusú, valamint kontroll transzgenikus és vad típusú egereket használtunk, csoportonként 10-10 állatot. A kezelés előtt az állatokkal háromszor elvégeztük a teszteket gyakorlás céljából, három egymást követő napon. A viselkedési teszteket délelőtt 9 és délután 4 között végeztük. Az etanol kezelés után 10 perccel kezdtük meg a magatartás tesztek elvégzését.

Lépés-mintázat (Footprint) analízis

Az állatok járási mintázatát az úgynevezett *Footprint* analízissel vizsgáltuk (Pandey és mtsai. 2008). A vizsgálat során az állatok egy 60 cm hosszú, 7 cm széles, 10 cm magas falakkal ellátott kifutón haladtak végig. A kifutó kiindulási végén egy lámpát, a másik végén egy sötét dobozt helyeztünk el, ezzel motiválva az állatokat a végighaladásra. A kifutó alját fehér papírral fedtük le, az egerek mellső és hátsó talpát pedig különböző színű ételfestékkel színeztük be, így rögzítve a lábnyomokat. A lábnyomat középső harmadában vizsgáltuk a lépéseket. A következő paramétereket mértük: mellső és hátsó láb lépésének hossza, illetve szélessége, valamint a mellső és hátsó lábnyomok átfedése.

Egyensúlyozás (Balance beam) teszt

Az állatok egyensúlyérzékét és mozgáskoordinációját a *Balance beam* tesztrel vizsgáltuk (Crabbe és mtsai. 2003). Az állatoknak egy 1 méter hosszú, 10 mm átmérőjű rúdon kellett végighaladniuk. A rúd kiindulási végén egy lámpát, a másik végén egy sötét dobozt helyeztünk el, ezzel motiválva az állatokat a végighaladásra. A kísérlet során azt mértük, hogy az állatok mennyi idő alatt jutnak el a rúd végéig, illetve megszámoltuk, hogy hányszor veszítik el az egyensúlyukat, illetve esnek le a rúdról.

Fordított rács (Inverted screen) teszt

Az *Inverted screen* tesztrel az állatok izomerejét és koordinációs képességét teszteltük (Sills és mtsai. 2000). Az egereket egy 50 cm magasan elhelyezett, 25x30 cm-es fémháló közepére helyeztük, majd a hálót 180°-kal elfordítottuk. A teszt során azt vizsgáltuk, hogy az állatok fel tudnak-e mászni a háló tetejére.

Fluoro-JadeC festés

10 µm vastagságú, acetonban fixált, fagyasztott metszeteket használtunk a festéshez. A mintákat 3 percig 96%-os, majd 1 percig 70%-os végül 1 percig 30%-os etanolban

inkubáltuk, ezt 1 perces mosás követte desztillált vízben. Ezután a mintákat 0,06%-os káliumpermanganát oldattal kezeltük 30 percig. Mosást követően a metszeteket 0,0004%-os, 0,1% ecetsavat tartalmazó Fluoro-JadeC oldatban inkubáltuk 30 percig. Újabb mosást és száradást követően a mintákat 2 percre xylolban áztattuk, majd miután megszáradtak DPX-el lefedtük azokat. A festés után az elhalt neuronok zölden fluoreszkálnak, ezeket egy Nikon Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

Az APPswe/PS1dE9/Hsp27 genotípusú transzgenikus egértörzs előállítás

A csoportunkban korábban előállított, FVB háttérű, Hsp27 fehérjét túltermelő állatokat négyszer kereszteztük vissza a C57BL/6 törzsszel, így Hsp27 túltermelő, homogén C57BL/6 genetikai háttérű egértörzset kaptunk. Az APPswe/PS1dE9 egértörzset, az Alzheimer-kór klasszikus, validált egérmodelljét, a Jackson Laboratory-tól (Bar Harbor, USA) szereztük be. A két törzset összekeresztezve APPswe/PS1dE9/Hsp27 genotípusú állatokat kaptunk. A transzgének jelenlétét az újszülöttekben polimeráz láncreakció segítségével mutattuk ki a korábban leírt módon. A PCR reakciókhoz a következő primereket használtuk:

Hsp27 forward primer: 5'-GTC CCT GGA TGT CAA CCA CT-3'

Hsp27 reverz primer: 5'- GAC TGG GAT GGT GAT CTC GT-3'

APP forward primer: 5'-GAC TGA CCA CTC GAC CAG GTT CTG-3'

APP reverz primer: 5'-CTT GTA AGT TGG ATT CTC ATA TCC G-3'

Psen forward primer: 5'-AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA-3'

Psen reverz primer: 5'-GCC ATG AGG GCA CTA ATC AT-3'

Magatartás tesztek

A viselkedési tesztek során 7 hónapos, hím transzgenikus egereket és vad típusú alomtársaikat használtuk. Az állatokat 2-4 fős csoportokban tartottuk sztenderd körülmények között (24°C, 12 órás világos-sötét periódus). A tesztek megkezdése előtt az állatokat kézhez szoktattuk. A viselkedési tesztek délelőtt 9 és délután 4 között végeztük. A tesztek videokamerával rögzítették, az adatokat az EthoVision program segítségével értékeltük ki (EthoVision 2002, The Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands).

Open field teszt

Az egerek motoros aktivitását az *Open field* teszt segítségével vizsgáltuk (Choleris és mtsai. 2001). Az állatokat egyenként az ovális aréna (50x70x30 cm) közepére helyeztük. Az aréna centrális és perifériás területekre volt felosztva. 5 percig figyeltük az egyes állatok

motoros aktivitását, ezalatt az ágaskodások és a mosakodások számát is feljegyeztük. Továbbá megmértük az állatok által megtett út hosszát és a periférián eltöltött időt.

Barnes-féle labirintus (Barnes maze)

A Barnes-féle labirintus tesztet egy nemrég publikált protokoll alapján végeztük el ([doi:10.1038/nprot.2007.390](https://doi.org/10.1038/nprot.2007.390)). Az apparátus egy 100 cm átmérőjű, kör alakú platformból áll, ami szélén 20 db 5 cm átmérőjű lyuk helyezkedik el egymástól egyenlő távolságra. Az egyik lyuk alatt egy 19×6×7 cm-es dobozt helyeztünk el, ahova az állat be tudott menekülni. A doboz helye az egyes egerek esetében állandó volt, de a különböző egerek esetében más-más helyre helyeztük. A platformot sötétítő függönyökkel vettük körül, hogy a kísérletet folytató személyek jelenléte ne zavarja az állatokat. A függönyökre különböző formájú és színű alakzatokat helyeztünk, ami alapján az állatok tájékozódni tudtak. A kísérlet során az állatokat a platform közepére helyeztük, ezután 3 perc állt rendelkezésükre, hogy megtalálják a menekülő dobozt. Mikor az állat belemászott a dobozba, letakartuk annak nyílását, és 1 percig benne hagytuk az állatot. Ha az állat nem találta meg a dobozt a 3. perc végére, manuálisan 1 percre a dobozba helyeztük, aminek a kivezető nyílását letakartuk. Minden állattal naponta egyszer végeztük el a kísérletet, öt egymást követő napon. Megmértük a dobozba való belemászásig eltelt időt.

A nyolcadik napon megismételtük a kísérletet, de ezúttal nem használtuk a menekülő dobozt. Az állatoknak 2 perc állt rendelkezésükre feltérképezni a platformot, megmértük, mennyi idő alatt találták meg azt a lyukat, ahol korábban a menekülő doboz volt elhelyezve.

Morris-féle vízilabirintus (Morris Water Maze)

A térbeli tanulást és memóriát a Morris-féle vízilabirintus tesztel is megvizsgáltuk (Morris, 1981). A teszt során egy 100 cm átmérőjű, 60 cm oldalmagasságú medencét használtunk, ami 45 cm magasságig volt feltöltve 22-23°C-os vízzel. A vízbe tejet öntöttünk, hogy ne legyen átlátszó. A medence észak-keleti negyedének közepére helyeztünk el egy 5 cm átmérőjű pihenő platformot, 1 cm-rel a víz felszíne alá, így az az állatok számára nem volt látható. A medencét sötétítő függönyökkel vettük körül, hogy a kísérletet folytató személyek jelenléte ne zavarja az állatokat. A függönyökre különböző formájú és színű alakzatokat helyeztünk, ami alapján az állatok tájékozódni tudtak. A kísérlet során az állatokat a medencébe helyeztük fejjel a fal felé, a négy lehetséges kezdőpont egyikén. Ezután 90 másodperc állt rendelkezésükre, hogy megtalálják a platformot. Miután az állat kimászott a platformra, 10 másodpercig rajta hagytuk. Ha az állat nem találta meg a platformot másfél perc alatt, manuálisan rá helyeztük, és 10 másodpercig rajta hagytuk. Ezután a próbát

megismételtük, egy másik kezdőpontról indulva. A kísérletet minden állattal öt egymást követő napon végeztük el. Megmértük a platformra való kimászáshoz szükséges időt. Az egy napon elvégzett két próba eredményét átlagoltuk, és ezt használtuk az elemzéshez.

Egyes állatok a kísérlet során úszás helyett "lebegtek", tehát a próbák nagy részén mozdulatlanok voltak. Ezek az állatok a Barnes-féle labirintus teszt során is nagyon passzívan viselkedtek. Minden állat esetében megszámoltuk, hány olyan próba volt, ahol lebegő/passzív viselkedést mutattak, és azt kaptuk hogy 3 állat a próbák 70%-ában szinte mozdulatlan volt, ezért ezeket az állatokat kizártuk a viselkedési tesztek értékelése során.

Immunhisztokémia

A viselkedési tesztek után az állatok egy csoportjának agyából 10 µm-es, acetonban fixált, fagyasztott metszeteket készítettünk. Az állatok agyában az amiloid plakkokat illetve az apoptótikus sejteket immunhisztokémiai módszerrel tettük láthatóvá. A festéseket a már fentebb leírt módon végeztük el. A következő elsődleges ellenanyagokat használtuk: nyúlban termeltetett anti-A β (Invitrogen 1:60) illetve nyúlban termeltetett anti-aktivált kaszpáz-3 (Cell Signalling 1:50). Másodlagos ellenanyagként anti-nyúl ellenanyagot alkalmaztunk (Jackson ImmunoResearch 1:150) 45 percig. A 7 hónapos állatokból csoportonként 6, a 14 hónapos korúakból csoportonként 5 állatot vizsgáltunk. Állatonként két (A β festés) illetve egy (aktivált kaszpáz-3 festés) metszetet festettünk meg. Minden metszetről 15 fényképet készítettünk az agykérgi és hippocampális területekről, majd az amiloid plakkokat illetve apoptótikus sejteket kétszer megszámoltuk. A kapott értékeket állatonként átlagoltuk, és ezt az átlagot használtuk a statisztikai kiértékelés során.

Idegsejt elhalás kimutatása Fluoro-JadeC festéssel

A APPswe/PS1dE9 és APPswe/PS1dE9/Hsp27 állatok esetében is megvizsgáltuk az idegsejtek elhalását Fluoro-JadeC festéssel is. A festést a már fentebb leírt módon végeztük el. A 7 hónapos állatokból csoportonként 6, a 14 hónapos korúakból csoportonként 5 állatot használtunk. Állatonként két metszetet festettünk meg, minden metszetről 15 fényképet készítettünk az agykérgi és hippocampális területekről, majd az elhalt neuronokat minden fotón kétszer megszámoltuk. A kapott értékeket állatonként átlagoltuk, és ezt az átlagot használtuk a statisztikai kiértékelés során.

Elektrofiziológiai mérések hippocampusz szeleteken

A szokásos eljárást követve, 350 μm vastag szeleteket készítettünk 3 hónapos egerek hippocampuszából McIlwain szövetszeletelő berendezést használva (Campden Instruments, Loughborough, UK). A szeleteket 37 C fokon egy órán keresztül mesterséges agy-gerincvelő folyadékban (ACSF) inkubáltuk, melyet folyamatosan karbogénnel átbuborékolattunk. Az ACSF összetétele mM-ban megadva: NaCl, 130; KCl, 3,5; CaCl₂, 2; MgCl₂, 2; NaH₂PO₄, 0,96; NaHCO₃, 24; D-glükóz, 10 (pH 7,4). A szeleteket egy 3D-MEA csipre helyeztük, melynek 60 elektródja 60 μm -re emelkedett ki a felszíntől, és egymáshoz képest 100 μm -re helyezkedtek el (Qwane Biosystems, S.A., Lausanne, Svájc). A szeleten folyamatosan 34°C ACSF-et áramoltattunk keresztül 1,5 ml/perc sebességgel. Az adatokat egy kereskedelmi forgalomban elérhető MEA berendezés segítségével rögzítettük (Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Németország).

Ingerlési protokoll: Egy stabil, 15 perces kontrol szakaszt követően LTP-t (long term potentiation, hosszú távú potenciáció) indukáltunk theta-burst ingerléssel (TBS) a legnagyobb kiváltható válasznak megfelelő ingerlési erősséggel. A TBS 15 burst ingerlési sorozatból állt, melyeket 5 Hz-el adtuk le. Egy burst 4 ingerlésből állt 100 Hz-es frekvenciával.

Ezek a vizsgálatok Dr. Szegedi Viktor laboratóriumában (SZBK, Biokémia Intézet) együttműködés keretén belül történtek.

Statisztikai analízis

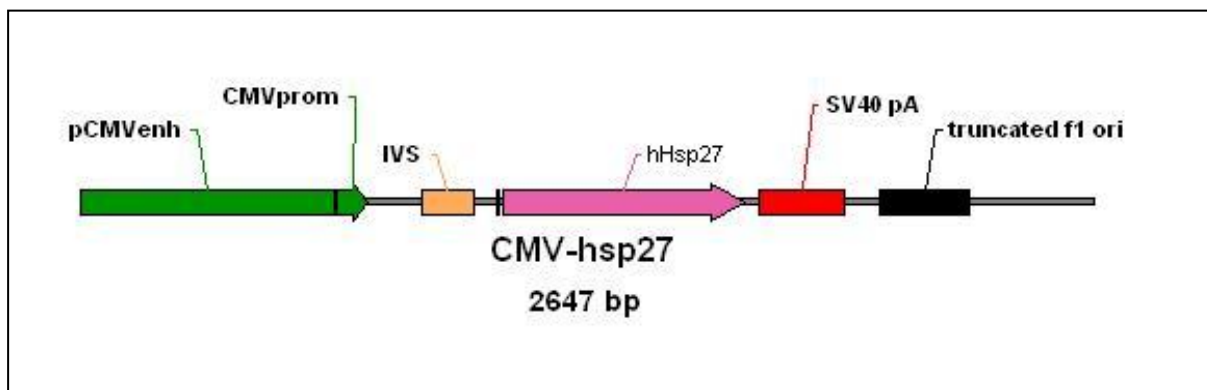
A kísérletek statisztikai kiértékeléséhez ANOVA-t (analysis of variance, varianciaanalízis) használtunk Fisher-LSD post hoc teszt alkalmazásával. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ -ben határoztuk meg. A számításokhoz az Origin Pro8 programot alkalmaztuk.

EREDMÉNYEK

Transzgenikus egerek előállítása

Korábbi irodalmi adatok arra utalnak, hogy a kismolsúlyú hősokkfehérjék neuroprotektív hatással rendelkeznek. Ezért munkánk során egy kismolsúlyú hősokkfehérjét, a Hsp27 fehérjét túltermelő egértörzset állítottunk elő, abból a célból, hogy megvizsgáljuk, a Hsp27 rendelkezik-e védő hatással különböző neurotoxikus folyamatokkal szemben.

A humán Hsp27 fehérjét kódoló cDNS-t a virális cytomegalovírus (CMV) promóter mögé klónoztuk, létrehozva a pCMV-hHsp27 vektort. A humán cytomegalovírus promóter az egyik legerősebb leírt promóter, amely magas szintű, konstitutív expressziót biztosít többféle emlős sejtben. A plazmidból a CMV-hHsp27 transzkripció egységet kivágtuk (**1. ábra**), és az így keletkező lineáris DNS fragmentet kitisztítottuk, majd 2 ng/μl koncentrációban injektáltuk.



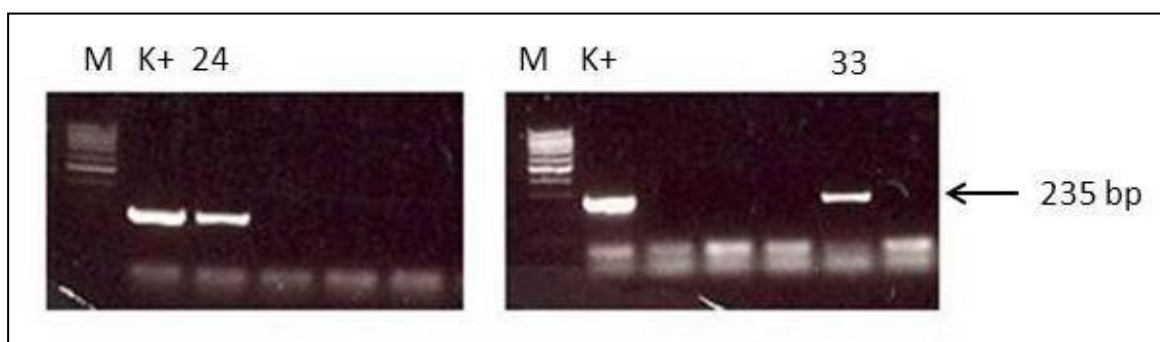
1. ábra Az injektáláshoz használt transzgén szerkezete

Szuperovulált FVB nőstényekből 462 petesejtet izoláltunk, majd 376-ot mikroinjektáltunk a linearizált CMV-hHsp27 transzgénnel, végül 273 petesejtet ültettünk vissza álvemhes nőstények petevezetőjébe. A visszaültetett petesejtekből 22 utód született meg (**1. táblázat**).

Izolált petesejtek száma	Mikroinjektált petesejtek száma	Visszaültetett petesejtek száma	Megszületett utódok száma	Transzgenikus egerek száma
462	376	273	22	2

1. táblázat Hsp27 túltermelő transzgenikus egérvonalak előállítása

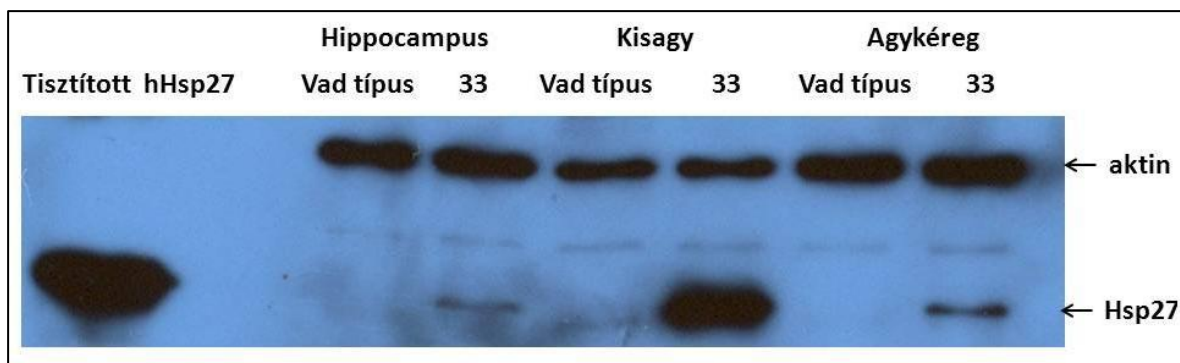
A megszületett utódokat PCR analízissel genotipizáltuk (**2. ábra**). A 22 utódból kettőben mutattuk ki a humán Hsp27 transzgén jelenlétét (24-es és 33-as vonal). A transzgént hordozó egyedeket ellenkező nemű FVB egyedekkel kereszteztük heterozigóta transzgenikus vonalak kialakítása céljából.



2. ábra A transzgének jelenlétének kimutatása az utódo kból PCR analízissel. M: molsúly marker; K+: pozitív plazmid kontrol. A nyíl a 235 bp nagyságú PCR amplifikált terméket jelöli.

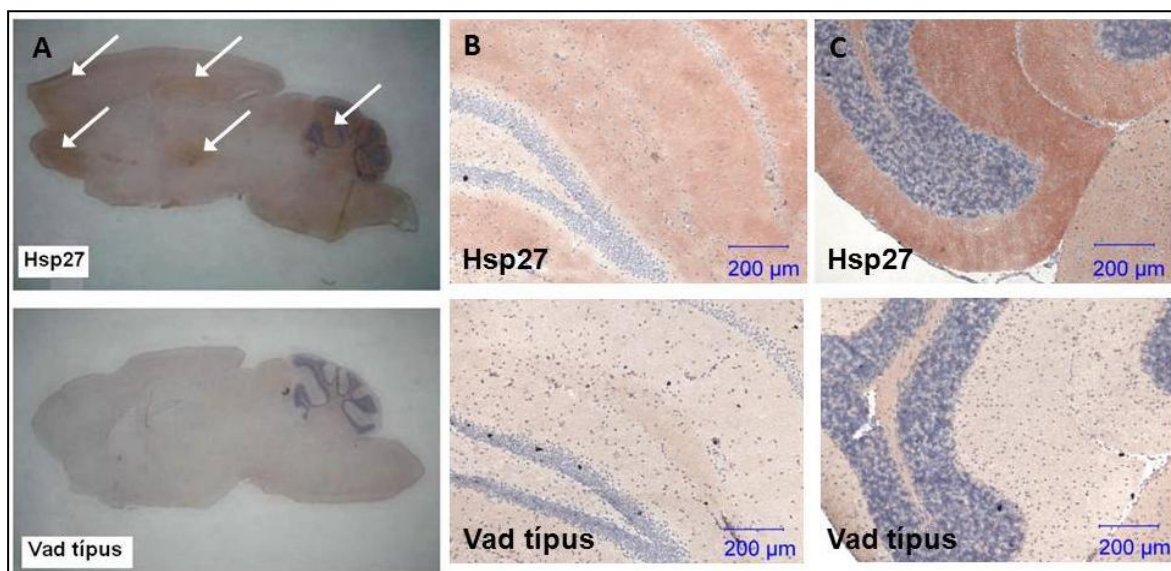
A transzgén kifejeződésének vizsgálata

A humán Hsp27 fehérje termelődését a transzgenikus vonalakban Western blot analízissel mutattuk ki. Az általunk használt Hsp27 ellenanyag csak a humán Hsp27 fehérjét ismeri fel, nem keresztreagál az egér endogén Hsp25 fehérjéjével. A vizsgálat során kiderült, hogy a két transzgenikus vonal közül csak 33-as vonalban expresszálódik a Hsp27 az agyban, emiatt a továbbiakban a Hsp27 neuroprotektív hatásainak tanulmányozásához ezt a törzset használtuk. A transzgén kifejeződését agyrégióként is megvizsgáltuk, a legtöbb humán Hsp27 fehérje a kisagyban termelődik, de az agykéregben és a hippocampusban is kimutatható (**3. ábra**).



3. ábra A transzgenikus fehérje kimutatása Western blot analízissel

A transzgenikus fehérje eloszlását az agyban immunhisztokémiai festéssel is megvizsgáltuk. A humán Hsp27 nagymértékű termelődése volt kimutatható, elsősorban az agykéregben, a kisagyban, szaglólebenyben és a hippocampusz területén (**4. ábra**).



4. ábra A transzgenikus humán Hsp27 fehérje kifejeződése. (A) A transzgén kifejeződésének eloszlása az állatok agyából készült saggitális metszeteken. Az erős barna festődés (fehér nyilakkal jelölve) nagy mennyiségű humán Hsp27 fehérje jelenlétére utal. A sejtmagokat hematoxilin festéssel tettük láthatóvá. (B) Hippokampális és (C) kisagyi régiók 200x-os nagyításban.

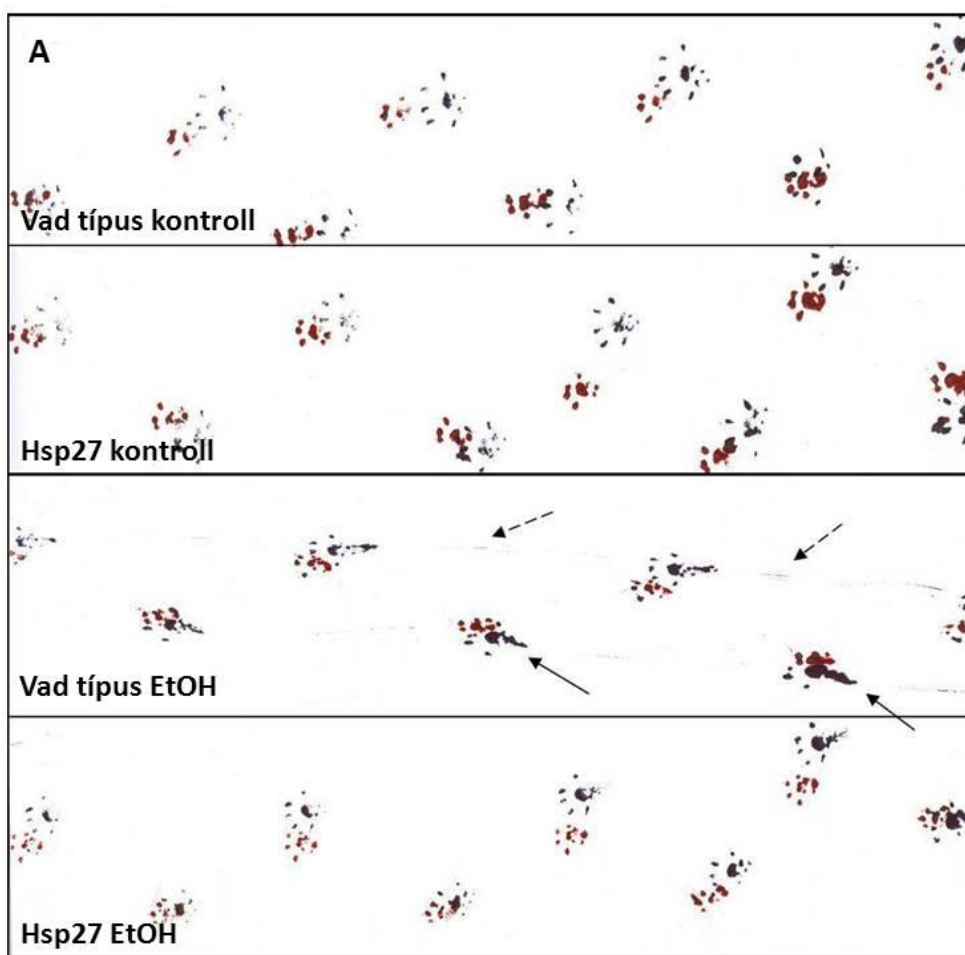
Akut etanol kezelés hatásának vizsgálata

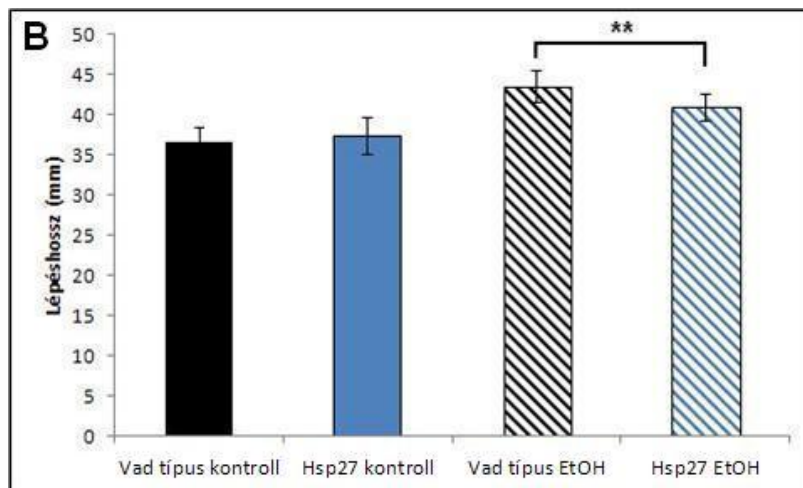
Az alkohol kezelés azonnali hatását különböző magatartás tesztekkel vizsgáltuk. Ezek a tesztek főként az ataxia, mozgáskoordináció és egyensúlyi zavarok vizsgálatára irányultak. A tesztek során arra voltunk kíváncsiak, hogy a humán Hsp27 túltermelése befolyásolja-e az

akut etanol kezelés toxikus hatásait. Ennek érdekében transzgenikus és vad típusú állatokat intrapritoneálisan injektáltunk 2 g/ttkg etanollal, majd 10 perc elteltével elvégeztük a magatartás teszteket.

Lépés-mintázat (Footprint) analízis

Az úgynevezett *Footprint* analízis során az etanol kezelt és kontroll állatok járásának mintázatát hasonlítottuk össze. Csoportonként 10 állattal dolgoztunk, minden állattal kétszer végeztük el a tesztet, két egymást követő napon. Megfigyelhető, hogy a fiziológias sóoldattal kezelt, kontroll állatok csak a talpuk elülső felét használják járás során (**5.A ábra 1-2. sor**). Ezzel szemben az etanollal kezelt vad típusú állatok egész talpa érintkezik a talajjal, valamint jellemző, hogy húzzák a lábukat a földön, ami jellegzetes mintázatot ad (**5.A ábra 3. sor**). Ugyanakkor az etanol kezelt transzgenikus állatok járásának mintázata nem ennyire inkoordinált (**5.A ábra 4. sor**), jobban hasonlít a nem-kezelt kontroll állatokéra.



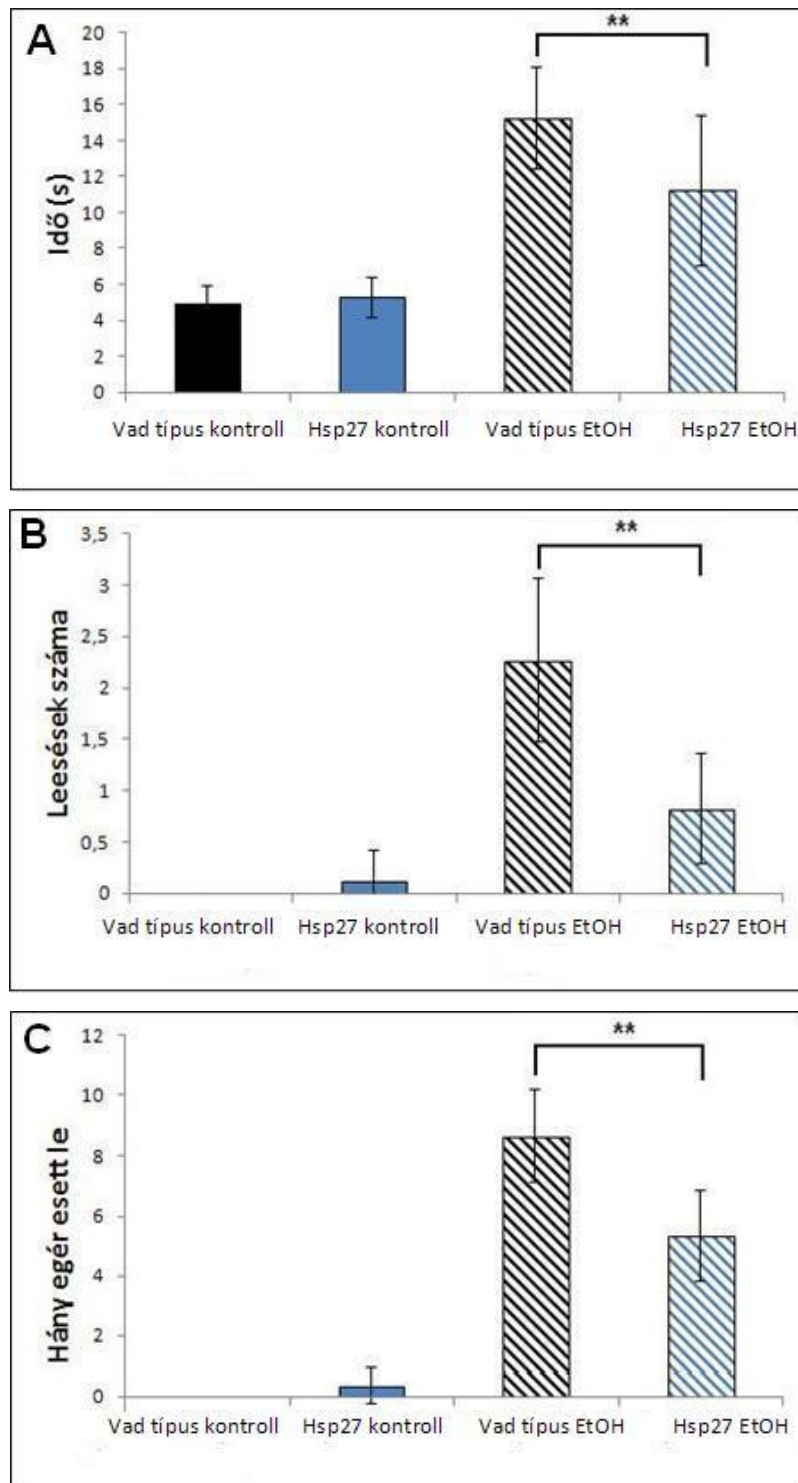


5. ábra Footprint teszt (A) Az etanollal kezelt vad típusú állatok húzzák a lábukat (szaggatott nyíl), illetve teli talppal lépnek a földre (nyíllal jelölve) **(B)** A lépéshosszak összehasonlítása A feltüntetett értékek: átlag ± szórás, vad típus kontroll, (n=10), vad típus etanol kezelt (n=10), Hsp27 kontroll, (n=10), Hsp27 etanol kezelt (n=10), **p<0,01

A jobb összehasonlíthatóság érdekében megmértük az állatok lépéshosszát és szélességét, illetve a mellső és hátsó lábnyomok átfedését. Hat-hat lépést mértünk meg állatonként. Az etanol kezelés hatására az állatok hosszabbakat léptek, de az etanol kezelt transzgenikus állatok lépéshossza szignifikánsan rövidebb volt az etanol kezelt vad típushoz képest ($p < 0.01$) **(5.B ábra)**.

Egyensúlyozás (Balance beam) teszt

A továbbiakban az etanol kezelt állatok mozgáskoordinációját és egyensúlyérzékét a *Balance beam* tesztrel vizsgáltuk. Háromszor, három egymást követő napon végeztük el a tesztet, csoportonként 10-10 állattal dolgoztunk. A kísérlet során megmértük, hogy mennyi időbe telik az állatoknak végighaladni egy 1 cm átmérőjű rúdon. Ez a fiziológiás sóoldattal kezelt, kontroll állatok esetében átlagosan 5 mp volt, ami etanol kezelés hatására megnőtt a vad típusú állatokban átlagosan 15 mp-re. A kezelt transzgenikus állatoknak szignifikánsan kevesebb időre (11 mp) volt szükségük ahhoz hogy a rúd végére érjenek. ($p < 0,01$) **(6.A ábra)**. Ugyancsak szignifikáns eltérést tapasztaltunk a rúdról történő leesések számában ($p < 0,01$). A nem-kezelt, kontroll állatok egyszer sem estek le a rúdról a kísérlet során, etanol kezelés után azonban a vad típusú állatok átlagosan több, mint kétszer a transzgenikusak kevesebb, mint egyszer estek le a rúdról **(6.B ábra)**. Az etanol kezelt vad típusú állatok 86%-a leesett legalább egyszer, míg ez az arány a transzgenikus állatok esetében csak 53% volt ($p < 0,01$) **(6.C ábra)**.

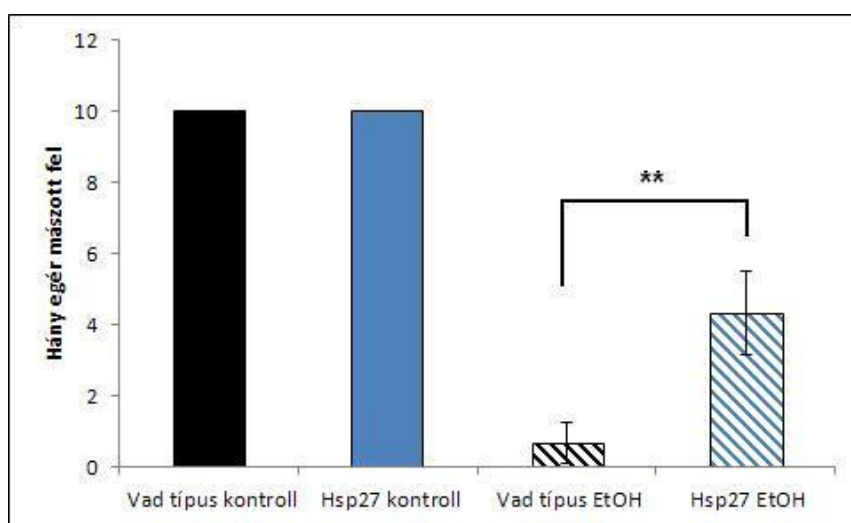


6. ábra Az etanol hatásának vizsgálata Balance beam tesztben (A) A rúdon való végighaladáshoz szükséges idő (B) Leesések száma egy egérre nézve (C) Leesések száma csoportonként. A feltüntetett értékek: átlag \pm szórás, vad típus kontroll (n=10), vad típus etanol kezelt (n=10), Hsp27 transzgenikus kontroll (n=10), Hsp27 transzgenikus etanol kezelt (n=10), **p<0,01

Fordított rács (Inverted screen) teszt

Ezzel a vizsgálattal az állatok koordinációs képességét és izomerejét teszteltük az “Anyagok és Módszerek” fejezetben leírtak szerint. A csökkent mozgáskoordinációjú és legyengült állatok nem képesek alulról felmászni a rács tetejére. Kísérletünkben az összes kontroll állat (nem kezelt csoportok) teljesítette a tesztet, és felmászott a rács tetejére. Etanol kezelés hatására azonban a vad típusú állatok közel 100%-a leesett a hálóról, míg a transzgenikus egerek 43%-a teljesítette a tesztet ($p<0,01$) (7. ábra)

A magatartás tesztek eredményeiből látható, hogy az etanol kezelés hatására jelentősen romlott a vad típusú állatok mozgáskoordinációs képessége, míg a Hsp27 túltermelés hatására ez a romlás szignifikánsan kisebb mértékű volt.

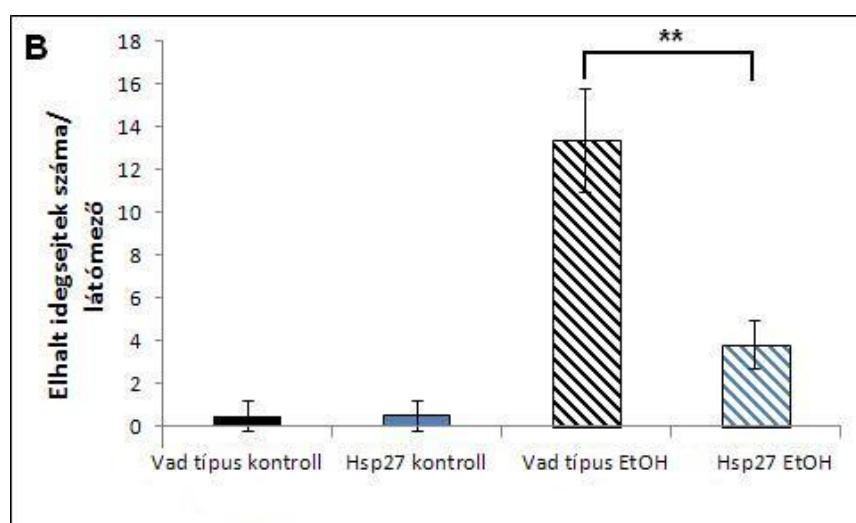
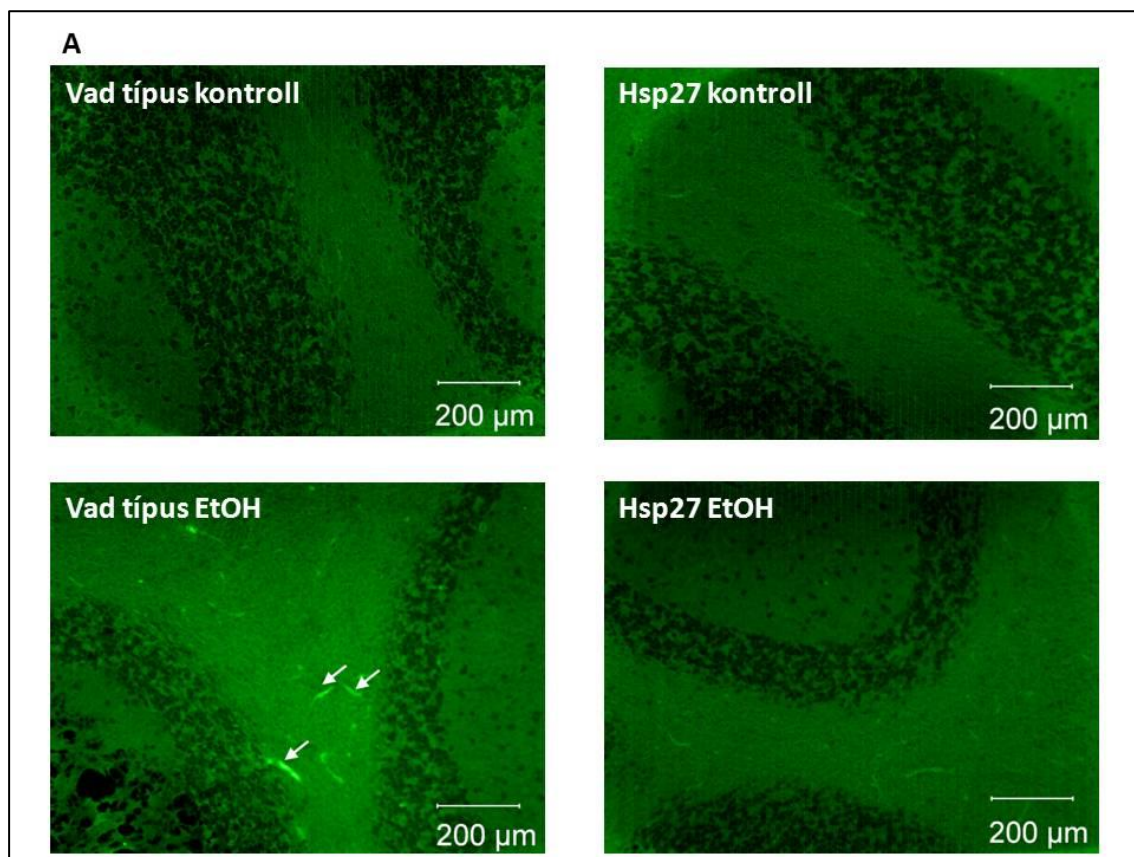


7. ábra Az etanol hatásának vizsgálata Inverted screen tesztben. A feltüntetett értékek: átlag ± szórás, vad típus kontroll (n=10), vad típus etanol kezelt (n=10), Hsp27 transzgenikus kontroll (n=10), Hsp27 transzgenikus etanol kezelt (n=10), ** $p<0,01$

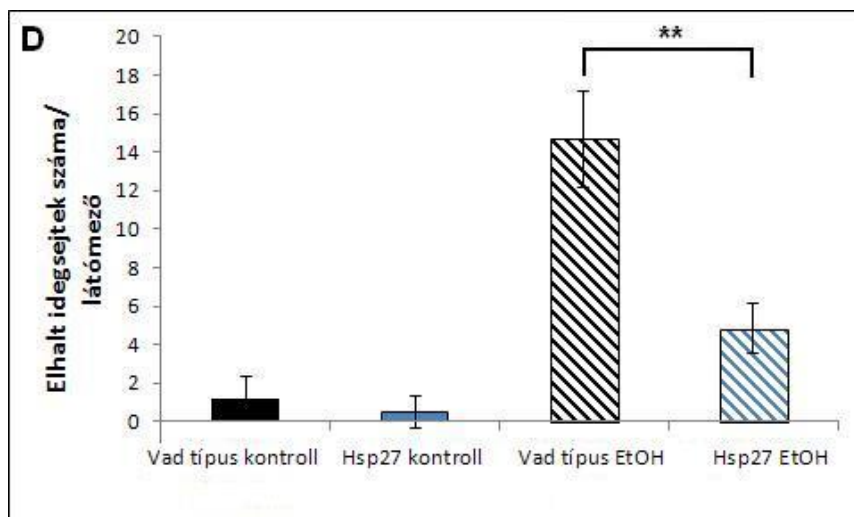
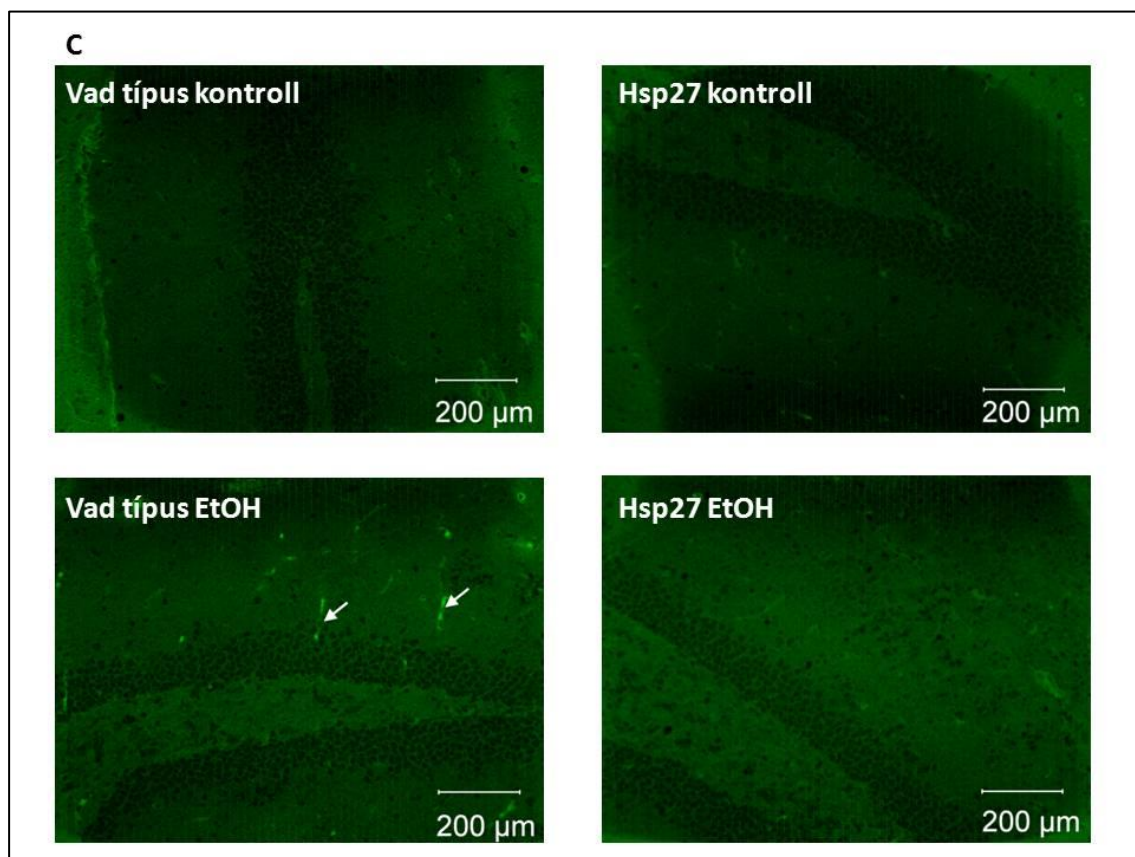
Hsp27 neuroprotektív szerepének vizsgálata krónikus etanol kezelés alatt

Szerettük volna megvizsgálni azt is, hogy a Hsp27 fehérje túltermelésének van-e védő hatása a krónikus etanol kezelés toxikus hatásaival szemben az idegrendszerben. Ennek érdekében egy 8 napos adaptációs időszakot követően, az egerek ivóvizét 20%-os etanollal helyettesítettük 5 hétig. A kezelés után az állatok agyából fagyasztott metszeteket készítettünk, és az elhalt idegsejteket Fluoro-JadeC-festékkel megfestettük. A Fluoro-JadeC egy anionos fluoreszcens festék, amely specifikusan kötődik az elhalt idegsejtekhez (Schmued és mtsai. 2005). Az agykéreg és a kisagy területéről 5-5, a hippocampusból 3 digitális fotót készítettünk metszetenként, majd a fotókon megszámoltuk a megjelölt idegsejteket. Azt tapasztaltuk, hogy mindhárom régióban jelentősen megnőtt az elhalt

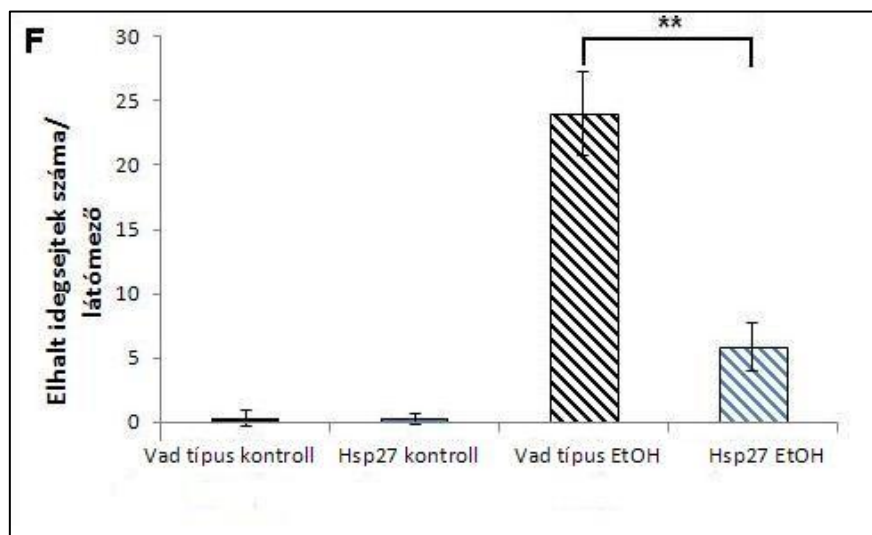
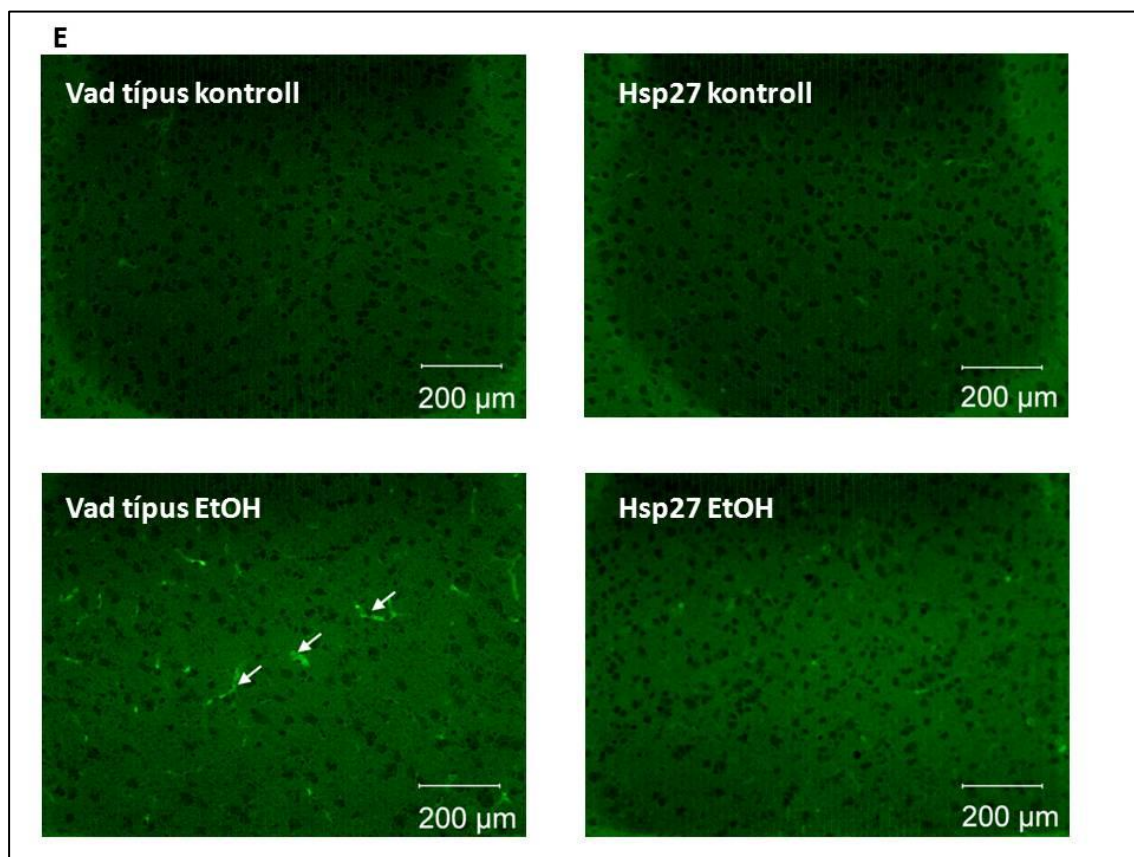
idegsejtek száma az etanol kezelést követően, azonban szignifikánsan kevesebb elhalt idegsejtet találtunk az etanol kezelt transzgenikus állatok agyában az etanol kezelt vad típushoz képest mind a kisagy (8.A-B ábra), mind a hippocampusz (8.C-D ábra), mind az agykéreg területén (8.E-F ábra) ($p < 0,01$).



8. ábra Az etanol neurotoxikus hatásának kimutatása Fluoro-JadeC festéssel. (A) kisagyi terület (B) mennyiségi összehasonlítás, ** $p < 0,01$



8. ábra Az etanol neurotoxikus hatásának kimutatása Fluoro-JadeC festéssel (C) hippocampális régió (D) mennyiségi összehasonlítás, ** $p < 0.01$



8. ábra Az etanol neurotoxikus hatásának kimutatása Fluoro-JadeC festéssel (**E**) agykéreg (**F**) mennyiségi összehasonlítás, ** $p < 0.01$

Hsp27 neuroprotektív szerepének vizsgálata Alzheimer-kórban

Következő kísérletsorozatunkban azt vizsgáltuk, hogy Hsp27 fehérje rendelkezik-e neuroprotektív hatással olyan neurodegeneratív jellegű betegségben, mint például az Alzheimer-kór. Kísérleteinkhez az Alzheimer-kór validált állatmodelljét, az APPswe/PS1dE9 egértörzset használtuk (AD modell egértörzs), amelyben az amiloid prekursor protein és a presenilin1 gének mutáns formái termelődnek túl, és az Alzheimer-kór tünetei (tanulás és memória gyengülése, amiloid plakk képződés, neurodegeneráció) markánsan jelentkeznek (<http://jaxmice.jax.org/strain/004462.html>). Mivel ez a törzs C57BL/6 genetikai háttérű, ezért a csoportunkban korábban előállított, FVB háttérű, Hsp27 fehérjét túltermelő egereket négyszer kereszteztük vissza a C57BL/6 törzssel, hogy Hsp27 túltermelő, homogén C57BL/6 genetikai háttérű egértörzset kapjunk. Ezután a két azonos (C57BL/6) genetikai háttérű törzset keresztük össze, és így olyan AD modellhez jutottunk, amely a humán Hsp27 fehérjét túltermeli (APPswe/PS1dE9/Hsp27 genotípusú állatok). A transzgének jelenlétét az állatokban PCR reakcióval teszteltük.

Magatartás tesztek

Az Alzheimer-kór jellegzetes elváltozásai (amiloid plakk képződés, neurodegeneráció) az egérmodellekben kb. 6 hónapos kor körül alakulnak ki. Ezért a kísérletsorozat első lépésében 7 hónapos korú állatok memóriáját, tanulási képességeit vizsgáltuk különböző viselkedési tesztekben. A kísérletekhez az állatokat három csoportra osztottuk: a) vad típusú csoport (n=9), b) APPswe/PSE1dE9 csoport (n=11) és c) APPswe/PSE1dE9/Hsp27 csoport (n=12).

Open field teszt

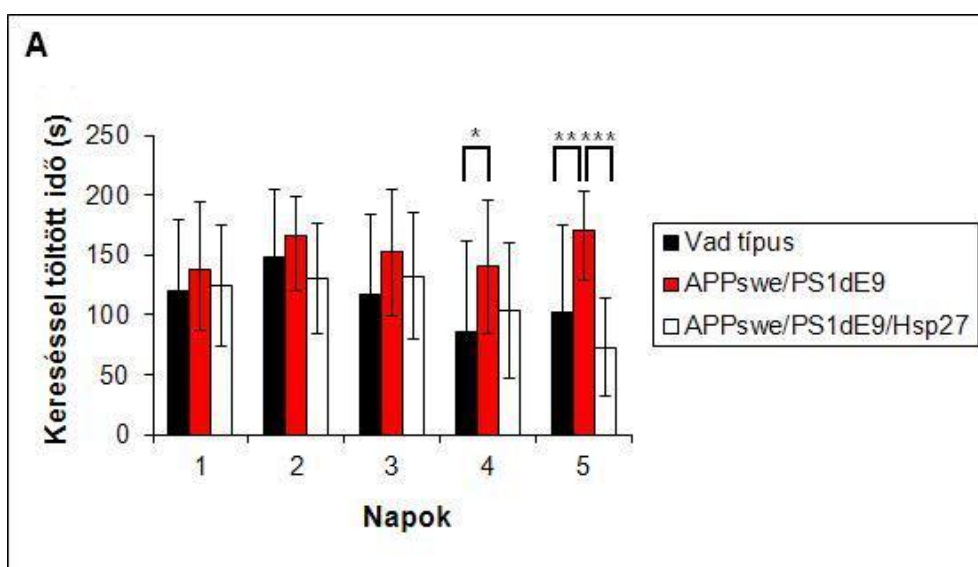
Legelőször az állatok motoros aktivitását (az arénában megtett út hossza), tájékozódási szokásaikat (pl: felágaskodások száma) és az esetleges szorongásra való hajlamukat (centrális és perifériás területen eltöltött idő aránya, mosakodások száma) vizsgáltuk. Nem találtunk szignifikáns különbséget a különböző egércsoportok között a fenti tulajdonságokban.

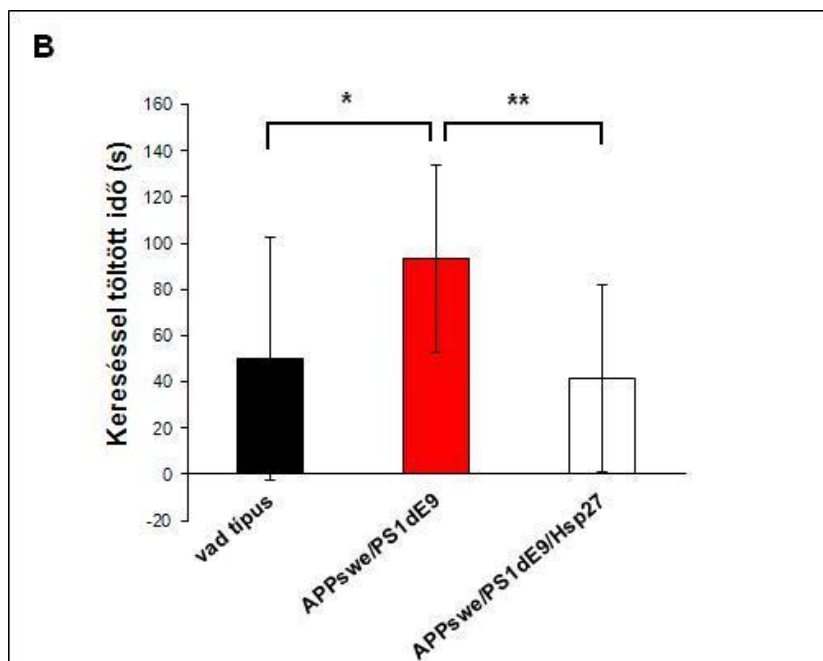
Barnes-féle labirintus teszt (Barnes-maze)

A térbeli tanulást és memóriát a Barnes-féle labirintus és a Morris-féle vízilabirintus tesztrel vizsgáltuk. Mindkét teszt a térbeli tájékozódáson alapul, és az állatok teljesítménye nagyban függ a hippocampusban található neuronok állapotától (Kennard és Woodruff-Pak, 2011). Az eredményeink azt mutatják, hogy a térbeli tanulás képessége erősen csökkent az APPswe/PS1dE9 genotípusú állatokban, mivel csak lassan tanulták meg illetve nem emlékeztek a menekülő doboz helyére. Ezzel szemben a vad típusú és az

APPswe/PS1dE9/Hsp27 genotípusú állatok pár napon belül megtanulták, hol helyezkedik el a menekülő doboz, és egyre kevesebb időt töltöttek annak keresésével. Az APPswe/PS1dE9 állatok a kísérlet mind az öt napján átlagosan több, mint 130 mp-ig keresték a menekülő dobozt, míg a másik két csoport esetében a kezdeti értékek a 4.-5. napra jelentősen lecsökkentek. A negyedik napon a vad típusú állatok átlagosan 86 mp-et töltöttek kereséssel, és ezzel teljesítményük szignifikánsan jobb volt, mint az APPswe/PS1dE9 csoporté (140 mp; $p < 0,05$). A vad típusú és az APPswe/PS1dE9/Hsp27 csoport keresési ideje között nem volt szignifikáns különbség. Az ötödik napon a doboz megtalálásáig eltelt idő a vad típusú állatok esetében 101 mp volt, az APPswe/PS1dE9/Hsp27 csoportok esetében pedig 72 mp, így mindkét csoport szignifikánsan jobban teljesített az APPswe/PS1dE9 genotípusú állatokkal összehasonlítva (169 mp; $p < 0,01$ illetve $p < 0,001$). A vad típusú és az APPswe/PS1dE9/Hsp27 csoport teljesítménye között ezen a napon sem volt szignifikáns különbség (9.A ábra).

A teszt öt napon keresztül tartott, majd két nap pihenő után megismételtük a kísérletet, de ezúttal nem helyeztük el a menekülő dobozt a megfelelő lyuk alá. Ezzel a teszttel azt vizsgáltuk, az állatok emlékeznek-e a doboz helyére. Hasonló eredményt kaptunk, mint az ötödik napon. A vad típusú és az APPswe/PS1dE9/Hsp27 csoport 50 illetve 41 mp alatt talált el a cél lyukhoz, tehát szignifikánsan rövidebb idő alatt, mint az APPswe/PS1dE9 csoport (93 mp; $p < 0,05$ illetve $p < 0,01$), míg a vad és APPswe/PS1dE9/Hsp27 típusú állatok ideje között nem volt szignifikáns különbség (9.B ábra).



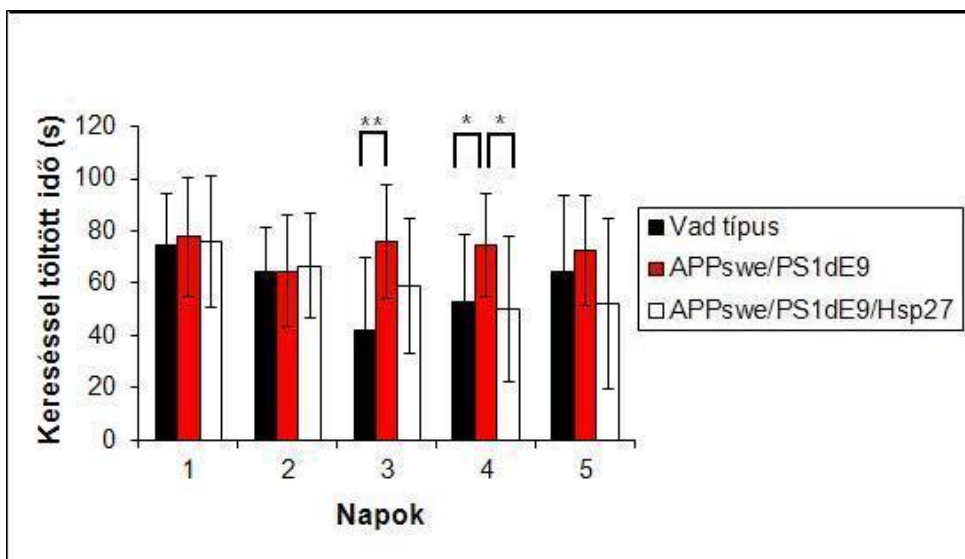


9. ábra A tanulás és a memória vizsgálata transzgenikus egerekben Barnes-maze tesztel. (A) A menekülő doboz megtalálásához szükséges idő alakulása a teszt első öt napján. **(B)** A menekülő doboz helyének megtalálásáig eltelt idő a kísérlet nyolcadik napján (Probe trial) A feltüntetett értékek: átlag \pm szórás, vad típus (n=9), APPswe/PS1dE9 (n=11), APPswe/PS1dE9/Hsp27 (n=12), *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Morris-féle vízi labirintus teszt (Morris water-maze)

A térbeli tanulásban bekövetkezett változásokat a Morris-féle vízilabirintus tesztel is megvizsgáltuk. Hasonló eredményeket kaptunk, mint a Barnes-féle viselkedési teszt során, azaz az APPswe/PS1dE9 genotípusú állatok térbeli tanulási képessége csökkent a vad típusú és az APPswe/PS1dE9/Hsp27 állatokéhoz viszonyítva.

A tanulásbeli különbségek a harmadik illetve negyedik napra váltak szignifikánssá. A harmadik napon a vad típusú csoport keresési ideje 42 mp-re csökkent, így teljesítményük szignifikánsan jobb volt az APPswe/PS1dE9 csoporttal összehasonlítva (p<0,01). A negyedik napon az APPswe/PS1dE9/Hsp27 csoport keresési ideje is lecsökkent 50 mp-re, a vad típusú állatoké 52 mp volt, így mindkét csoport szignifikánsan jobban teljesített a APPswe/PS1dE9 csoporthoz képest (74 mp; mindkét esetben p<0,05), míg a vad típusú és az APPswe/PS1dE9/Hsp27 csoportok között nem volt szignifikáns eltérés (**10. ábra**).

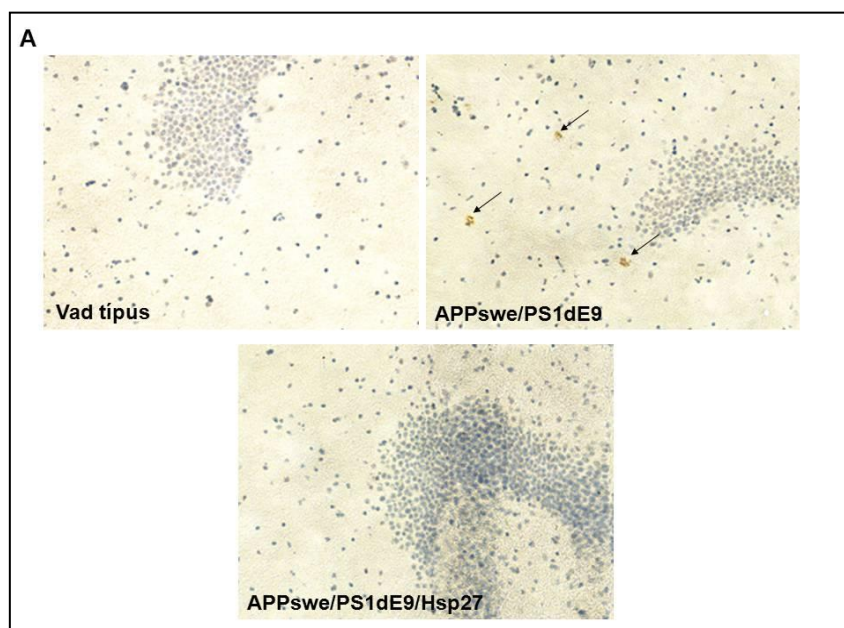


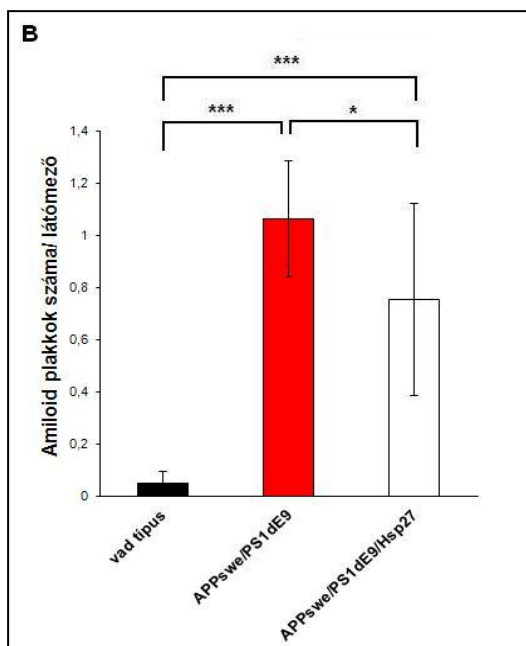
10. ábra A tanulás és a memória vizsgálata transzgenikus egerekben Morris water- maze teszttel. A platform megtalálásához szükséges idő alakulása a teszt öt napja során. A feltüntetett értékek: átlag \pm szórás, vad típus (n=9), APPswe/PS1dE9 (n=11), APPswe/PS1dE9/Hsp27 (n=12), *p<0,05; **p<0,01

Érdekes azonban, hogy az ötödik napra eltűnt a különbség a csoportok között, és a legtöbb egér rosszabbul teljesített az előző naphoz képest. Ez talán annak köszönhető, hogy a Morris water-maze teszt során az állatok számára a víz erős stressz-forrás, ami kihatással lehet a teljesítményükre (Harrison és mtsai. 2009).

Amiloid -plakkok kimutatása

A viselkedési tesztek befejezése után az állatok egy részének agyából fagyasztott metszeteket készítettünk. Az amiloid plakkok kialakulását A β immunfestéssel vizsgáltuk.





11. ábra Amiloid plakkok kimutatása immunfestéssel.

(A) Fagyasztott metszetek immunhisztokémiai festése anti- A β (1-42) ellenanyaggal

(B) Amiloid plakkok mennyiségi összehasonlítása. A feltüntetett értékek: átlag \pm szórás, vad típus (n=6), APPswe/PS1dE9 (n=6), APPswe/PS1dE9/Hsp27 (n=6), *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

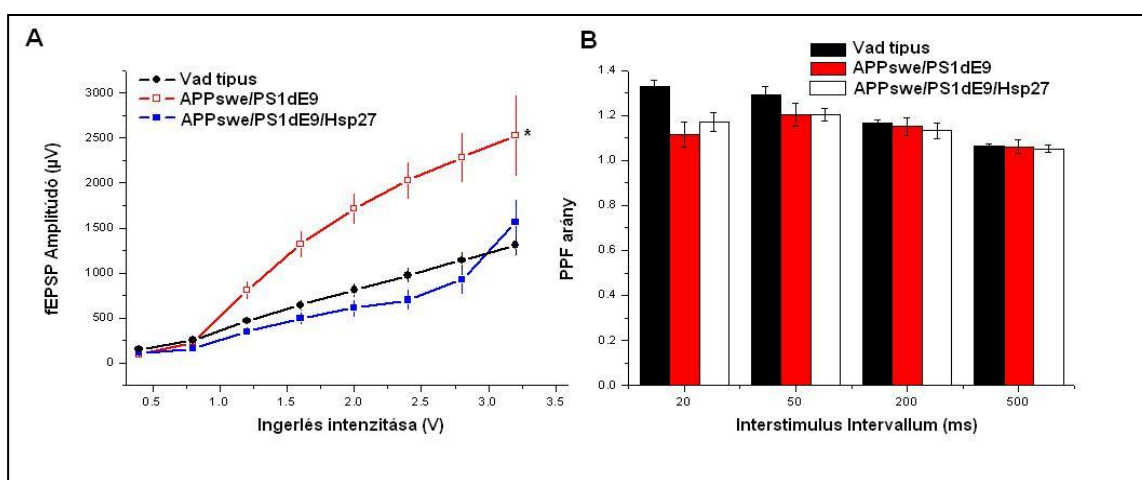
A vad típushoz viszonyítva az APPswe/PS1dE9 állatok agyának hippokampális és agykérgi régióiban jelentős A β lerakódást és plakk képződést tapasztaltunk (11.A ábra). Az APPswe/PS1dE9/Hsp27 genotípusú állatok agyában is megfigyelhetők voltak amiloid plakkok, de számuk szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az APPswe/PS1dE9 állatok agyában (p<0,05) (11.B ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a Hsp27 fehérje csökkentheti az A β peptid aggregációját és a plakkok kialakulását, illetve elősegítheti az A β peptid eltávolítását (fokozott clearance) és degradációját.

Elektrofiziológias vizsgálatok

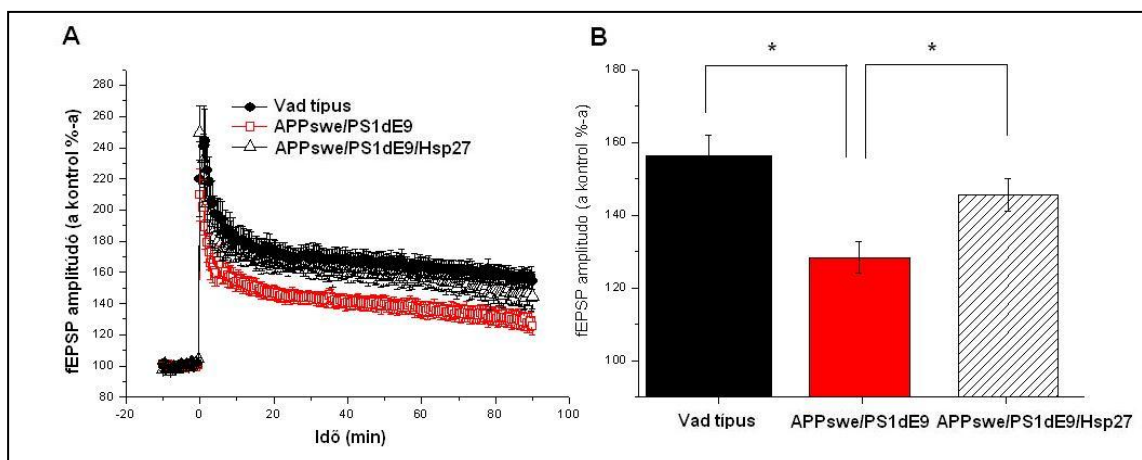
Az idegrendszer működésének vizsgálata céljából transzgenikus és vad típusú egerek hippokampális metszetein elektrofiziológias méréseket végeztünk. Ezek a vizsgálatok Dr. Szegedi Viktor (SZBK, Biokémia intézet) laboratóriumában, együttműködés keretén belül történtek. Az alap szinaptikus funkciók vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy az APPswe/PS1dE9 egereknél szignifikánsan megnövekedett az idegsejtek serkenthetősége (excitability), tehát azonos ingererősségre nagyobb választ (fEPSP-t, field excitatory postsynaptic potencial) lehetett elvezetni. Ez a fokozott serkenthetőség az APPswe/PS1dE9/Hsp27 egereknél nem tapasztalható, ingerlés hatására a vad típusú egerekhez hasonló mértékű válaszreakciót kapunk (12.A ábra). A páros pulzus facilitációs

mérések során nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a csoportok között, tehát a preszinaptikus funkciókat nem befolyásolta az állatok genotípusa (**12.B ábra**)

A hosszútávú szinaptikus potenciáció (LTP, long term potentiation) a szinaptikus plaszticitás egyik modellje. A vizsgálatok eredményeképpen azt kaptuk, hogy az APP^{swe}/PS1dE9 egerek esetében jelentősen csökkent a szinaptikus plaszticitás, azaz nagyon alacsony az ingerlésre adott válaszreakció amplitúdója. Ugyanakkor, a többszörösen transzgenikus egereknél (APP^{swe}/PS1dE9/Hsp27) a válaszreakció amplitúdója szignifikánsan nagyobb az AD modell egerekénél, bár még mindig kisebb, mint a vad típusú egereké (**13. ábra**).



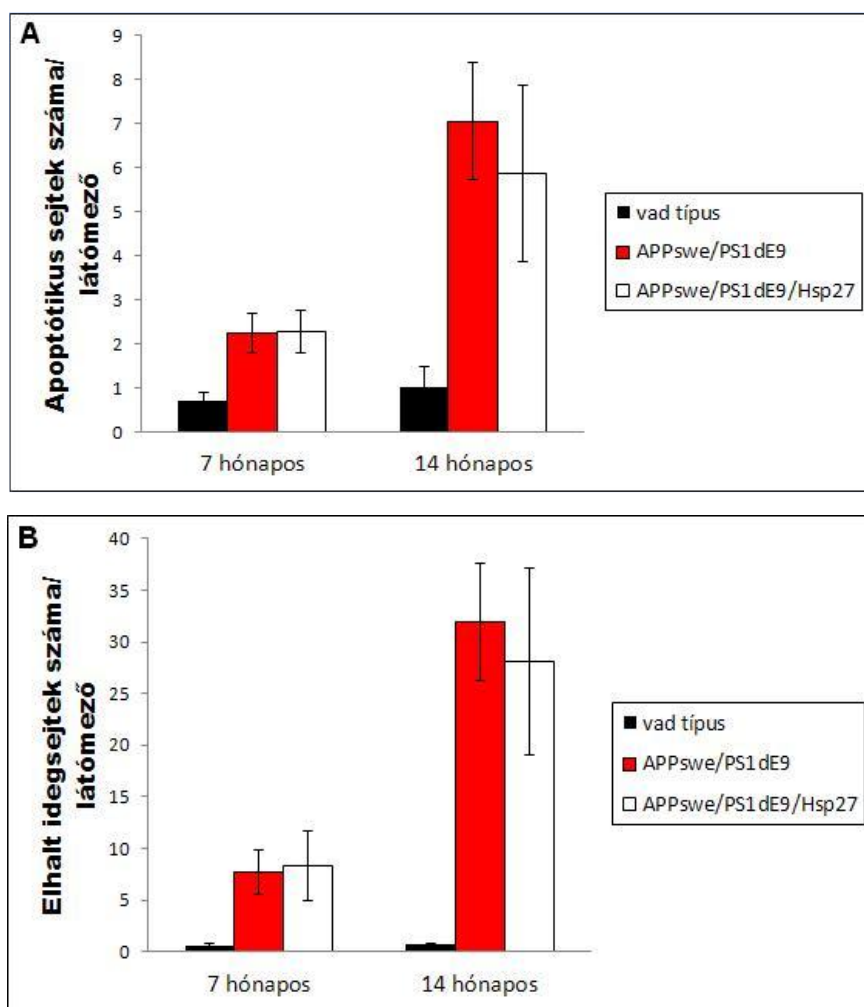
12. ábra (A) Alap szinaptikus funkciók vizsgálata, bemenet/kimenet görbék **(B)** Páros impulzus facilitáció különböző intervallumokban * $p < 0.05$



13. ábra Szinaptikus plaszticitás vizsgálata (A) LTP változása a traszgénnek hatására **(B)** Az utolsó 5 percben mért fEPSP amplitúdók átlaga * $p < 0.05$

Az idegsejtek pusztulásának vizsgálata

7 és 14 hónapos korú állatok agyában az elhalt neuronokat két féle módszerrel tettük láthatóvá, a) az aktivált kaszpáz-3 fehérje immunfestésével, illetve b) Fluoro-JadeC festéssel. Mivel az általunk használt ellenanyag kizárólag a kaszpáz-3 hasított, aktivált formájával reagált, ezért az immunfestés során csak az apoptotikus neuronok festődtek. A Fluoro-JadeC egy anionos fluoreszcens festék, ami specifikusan kötődik az elhalt idegsejtekhez (Schmued és mtsai. 2005).



14. ábra Idegsejt pusztulás vizsgálata transzgenikus egerek agyában. Az elhalt neuronok számának meghatározása **(A)** aktivált kaszpáz-3 ellenanyaggal és **(B)** Fluoro-JadeC festéssel 7 és 14 hónapos állatokban. A feltüntetett értékek: átlag \pm szórás, vad típus, 7 hónap, (n=6), APPswe/PS1dE9, 7 hónap (n=6) APPswe/PS1dE9/Hsp27, 7 hónap (n=6), vad típus, 14 hónap (n=5) APPswe/PS1dE9, 14 hónap (n=5), APPswe/PS1dE9/Hsp27, 14 hónap (n=5).

7 hónapos állatokban mind az APPswe/PS1dE9 mind az APPswe/PS1dE9/Hsp27 állatok esetében több elhalt neuront mutattunk ki a vad típushoz képest mindkét festési módszerrel. 14 hónapos korra a vad típusú állatokban az elhalt neuronok száma csak kis

mértékben, míg az APP^{swe}/PS1^{dE9} és az APP^{swe}/PS1^{dE9}/Hsp27 állatokban drasztikusan megemelkedett (**14. ábra**). 14 hónapos korban ugyan az elhalt neuronok száma kevesebb volt az APP^{swe}/PS1^{dE9}/Hsp27 állatokban az APP^{swe}/PS1^{dE9} állatokhoz viszonyítva, de ez a különbség nem volt szignifikáns.

DISZKUSSZIÓ

Számtalan tanulmány támasztja alá a stresszfehérjék, köztük a Hsp27 neuroprotektív szerepét a legkülönbözőbb idegrendszeri károsító hatásokkal szemben. A szervezetet ért különböző stressz hatásokra megemelkedik a hősokkfehérjék szintézise a különböző szervekben, többek között az agyban is. Például hipertermia hatására a Hsp27 nagymértékű expressziója mutatható ki az agykéregben, hippokampuszban és a kisagyban is (Krueger-Naug és mtsai. 2000). A megnövekedett expresszió elsősorban a glia sejtekre jellemző, de a neuronokban is kimutatható. Kainát kezelés (Akbar és mtsai. 2001), cerebrális ischemia (Kato és mtsai. 1994), illetve az agy sérülése esetén (Allen és Chase, 2001) is megnő a Hsp27 termelődése. Ezen kívül kimutatták, hogy a hősokkfehérjék expresziója megemelkedik különböző neurodegeneratív betegségek során (Calabrese és mtsai. 2004; Kalmar és Greensmith, 2009), illetve mind akut mind krónikus etanol fogyasztás hatására (Pignataro és mtsai. 2007, Calabrese és mtsai. 1996, Calabrese és mtsai. 1998). A stresszfehérjék fokozott termelődése segíti a sejteket többek között az oxidatív stressz, a szabadgyökök és a rendellenes szerkezetű fehérjék okozta károsodásokkal szembeni védekezésben (Calabrese és mtsai. 2004, Kalmar és Greensmith, 2009). Sok tanulmány foglalkozik a stresszfehérjék neurodegeneratív betegségekben kifejtett védő hatásával. Mivel a legtöbb ilyen betegségben kimutatható valamilyen rendellenes fehérje felhalmozódása, elsősorban azzal magyarázzák a stresszfehérjék protektív hatását, hogy azok képesek megakadályozni a fehérjék aggregációját, segítenek helyreállítani a károsodott fehérjék szerkezetét, illetve a menthetetlenül károsodott fehérjék lebontását is elősegíthetik. Kimutatták, hogy a Hsp70 a motoneuron betegség modelljében, illetve a Hsp104 a Parkinson-kór modelljében megakadályozta a fehérjék aggregációját, valamint csökkentette a betegségekre jellemző tüneteket (Katsuno és mtsai. 2005, Lo Bianco és mtsai. 2008). A stresszfehérjéknek nem csak a fehérjék szerkezetének megóvásában van szerepük, hatásosak az oxidatív stressz ellen, gátolják az apoptózis kialakulását, és a membrán védelmében is szerepet játszanak. Ezek a tulajdonságok szintén fontosak lehetnek a stresszfehérjék neuroprotektív szerepének kialakításában. A Huntington kór egy sejtes modelljében például kimutatták, hogy Hsp27 hatására csökken a poliglutamin által okozott sejtpusztulás mértéke, ugyanakkor fehérje aggregáció gátlást nem tapasztaltak, viszont csökkent a reaktív oxigén gyökök szintje (Wyttenbach, 2002).

Csoportunkban a humán Hsp27 fehérjét túltermelő egértörzsben *in vivo* vizsgáltuk a stresszfehérje neuroprotektív szerepét két különböző, idegrendszert károsító hatással szemben.

A Hsp27 védő hatása etanol kezeléssel szemben

Kísérleteink során megfigyeltük, hogy a Hsp27 túltermelése megvédi az idegsejteket az akut etanol kezelés káros hatásaival szemben. Szignifikáns különbséget találtunk a transzgenikus és vad típusú állatok teljesítménye között három magatartás tesztben, amelyekkel a mozgáskoordinációt és egyensúlyérzékletet vizsgáltuk etanol kezelést követően (Toth és mtsai. 2010). Az állatok járásának mintázatát összehasonlítva megfigyelhettük, hogy etanol kezelés hatására az állatok mozgása koordinálatlanná válik, ugyanakkor hosszabbakat lépnek, és gyorsabban mozognak, mint a fizioiógias sóoldattal injektált kontroll társaik. Ez az eredmény egybevág korábbi megfigyelésekkel, miszerint az alacsony dózisú etanol kezelés (1-2 g/ttkg) hatására megnő a lokomotor aktivitás egerekben (Matchett és Erickson 1977, Smooty és Berry 1984). Az etanol idegrendszerre kifejtett hatása rendkívül komplex és nem szelektív. Az etanolban levő hidroxil csoport hidrogén-kötéseket képes kialakítani a fehérjékkel és a membránokban található foszfolipidekkel, ezáltal különböző membránfehérjék, például ioncsatornák funkcióját befolyásolhatja az idegsejtek membránjában (Fadda és Rossetti 1998). Több magyarázat létezik arra vonatkozóan, hogy az etanol miként fejti ki hatását az idegsejteken. Egyes elméletek szerint közvetlenül kapcsolódik a membránfehérjék specifikus régióihoz, ezáltal konformációváltozást idéz elő a fehérje szerkezetében, ami végül kihat a fehérje funkciójára (Fadda és Rossetti 1998). Az úgynevezett lipid hipotézis szerint viszont az etanol elsődlegesen a membránokon fejti ki hatását, ezáltal közvetve befolyásolja a fehérjék működését. Akut etanol kezelés hatására nő a membránok rendezetlensége és fluiditása, ami viszont hatással van a receptorok és ioncsatornák működésére. Ezzel ellentétben, a krónikus alkohol kezelés beindíthat bizonyos kompenzáló mehanizmusokat, ami végeredményben a membránok rendezettségét fokozza (Balogh és mtsai. 2005).

Több kutatócsoport kimutatta, hogy a stresszfehérjék hatással vannak a membránok működésére. Megfigyelték, hogy a kismolsúlyú hősokkfehérjék hozzákapcsolódhatnak a membránokhoz növelve annak rendezettségét. Az *Oenococcus oeni* tejsavbaktérium 18 kDa nagyságú hősokkfehérjéje (Lo18) különböző stresszhatásokra (pl: hő vagy etanolkezelés) indukálódik, és etanol kezelés után a membránhoz kapcsolódik. Ennek hatására megváltoznak a membrán tulajdonságai, nő a molekulák rendezettsége, ezzel együtt csökken a membrán

fluiditása (Coucheney és mtsai. 2005). A Hsp60 családba tartozó GroEl fehérjéről szintén bebizonyosodott, hogy megnöveli a lipidek rendezettségét, és stabilizálja azokat stressz körülmények között (Török és mtsai. 1997). Hasonlóan viselkedik a *Synechocystis* nevű kékalga Hsp17 fehérjéje (Török és mtsai. 2000), ami a membránokhoz kapcsolódva megvédi azokat hőstressz során. Tsvetkova és mtsai. (2002) a kismolsúlyú hősokkfehérjék családjába tartozó α B-crystallinnal és a Hsp17-tel kapcsolatban figyelték meg, hogy mindkettő befolyásolja a membránok fluiditását, és stabilizálják a membrán szerkezetét *in vitro*. Gerincesekben kimutatták, hogy az α -crystallin képes hozzákapcsolódni az ocularis plazmamembránhoz, és szintetikus foszfolipid vezikulákhoz (Cobb és Petrash 2000). A fenti eredmények azt mutatják, hogy a kismolsúlyú hősokkfehérjéknek fontos szerepük lehet a membrán védelmében stressz körülmények között. A stresszfehérjék hasonló módon befolyásolhatják ioncsatornák működését, azáltal, hogy megváltoztatják a membrán szerkezetét, amiben ezek a csatornák megtalálhatók, de akár közvetlenül is kölcsönhatásba kerülhetnek az ioncsatorna fehérjékkel, vagy módosíthatják azok expresszióját (Ficker és mtsai. 2003, Krieger és mtsai. 2006, Kashlan és mtsai. 2007). Ezen tanulmányok és a saját eredményeink ismeretében arra következtethetünk, hogy a Hsp27 védelmet biztosíthat az akut etanol kezelés membrán és membrán fehérje-károsító hatásaival szemben.

Kísérleteink második fázisában a Hsp27 védő szerepét vizsgáltuk krónikus alkohol adagoláskor. A hosszú távú etanol fogyasztás neurodegeneratív folyamatokat vált ki az agy különböző régióiban. A tüneteket több faktor együttesen befolyásolja. A megnövekedett oxidatív stressznek valószínűleg fontos szerepe van az idegsejtek károsításában, de az alultápláltság, különböző vitaminok hiánya, és más szervek (pl. a máj) károsodása is hozzájárul a neurodegeneratív folyamatok kialakulásához. Több tanulmány azt mutatja, hogy krónikus etanol kezelés hatására megnő a szabadgyökök mennyisége és a lipid peroxidáció mértéke az agyban. Az agy különösen érzékeny az oxidatív stresszel szemben, mivel az idegsejtek membránjai gazdagok többszörösen telítetlen zsírsavláncokban, ezenkívül a kataláz és SOD aktivitás is alacsonyabb a neuronokban (Halliwell, 2006). Egy korábbi tanulmány szerint a szőlőben levő, erős antioxidáns tulajdonságú polifenolok megvédik az idegsejtek membránfehérjeit az etanol káros hatásaival szemben (Sun és mtsai. 1999), amiből szintén arra következtethetünk, hogy az etanol toxicitásában nagy szerepe van a megnövekedett oxidatív stressznek.

A hősokkfehérjék termelődését különböző stresszfolyamatok indukálhatják, ilyen például az oxidatív stressz. A Hsp27 képes megvédeni a sejteket az oxidatív stresszel szemben azáltal, hogy csökkenti a reaktív oxigén gyökök (ROS) szintjét. Több vizsgálat

kimutatta a Hsp27 védő hatását ischemia-reperfúziós állatmodellekben, ahol az oxidatív stressznek fontos szerepe van az idegsejtek pusztulásában. Ezen kívül a Hsp27 megnöveli a hidrogénperoxiddal kezelt idegsejtek életképességét (An és mtsai. 2008). Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a Hsp27 fokozott védelmet biztosít az oxidatív stressz által kiváltott sejtkárosodás ellen.

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a Hsp27 fehérje túltermelése valamennyi vizsgált agyrégióban (agykéreg, hippocampus, kisagy) csökkenti a károsodó idegsejtek számát a hosszú távú etanol kezelés alatt. A fenti eredmények fényében feltételezhetjük, hogy ez legalább részben a Hsp27 oxidatív stresszel szembeni védő hatása által valósul meg.

A Hsp27 szerepe az Alzheimer-kór szerű tünetek kialakulásának lassításában

Az Alzheimer-kór korai tünetei között szerepel a rövidtávú memória károsodása. Ismert, hogy a hippocampális szinaptikus hatékonyságban bekövetkező változások megelőzik az idegsejtek degenerációját, és a szinapszisok működési zavarát valószínűleg az A β peptidekből képződő diffúz oligomerek okozzák (Selkoe, 2002).

Több tanulmány rámutatott arra, hogy a szolubilis A β származékok (például a szolubilis oligomerek) mennyisége szorosabban összefügg a kognitív képességek romlásának mértékével, mint a plakkok sűrűsége (Naslund és mtsai. 2000, McLean és mtsai. 1999, Lue és mtsai. 1999). Amiloid plakkokat olyan egyéneknél is találtak, akik Alzheimer-kórra utaló tüneteket nem mutattak (Katzman és mtsai. 1988). Transzgenikus állatmodelleken folytatott kísérletekből kiderült, hogy a sejten belül felhalmozódó A β szinaptikus és elektrofiziológia működési zavarokat, viselkedésbeli változásokat okoz még azelőtt, hogy a sejten kívül, plakkok formájában lerakódna (Chui és mtsai. 1999, Moechars és mtsai. 1999, Kumar-Singh és mtsai. 2000, Mucke és mtsai. 2000). A fenti eredmények azt bizonyítják, hogy az A β fontos szerepet játszik az Alzheimer-kór tüneteinek kialakulásában. A fehérje toxikus formái, legyenek azok akár az oligomerek, vagy nagyobb aggregátumok, egy sor kedvezőtlen folyamatot indítanak el, amelyek végül az idegsejtek működési rendellenességeihez vezetnek. Ezért az A β lebontásának illetve oligomerizációjának befolyásolása kulcs szerepet játszhat az Alzheimer-kór megelőzésében illetve terápiája során. Több laboratóriumban kimutatták, hogy a stresszfehérjék hatékonyan gátolják a neurodegenerációt, ezért ígéretesek lehetnek különböző fehérjekonformációs rendellenességek gyógyításában (Muchowski és Wacker, 2005).

Munkánk során azt vizsgáltuk, milyen hatása lehet a Hsp27 túltermelésének az Alzheimer-kór tüneteinek kialakulása során transzgenikus egerekben. Ehhez az APPswe/PS1dE9 egértörzset használtuk, ami az Alzheimer-kór validált állatmodellje. Az egértörzs két mutáns gént termel túl, az amiloid prekursor protein (APP) svéd mutációját (APPSwe), illetve a presenilin1 gén “deltaE9” deléciós mutánsát. Az APP egy receptor szerű transzmembrán fehérje (Kang és mtsai. 1987), ami egyaránt előfordul idegsejtekben, és nem neurális szövetekben. Az APP fehérjét az esetek 90%-ban az α -szekretáz (TACE) hasítja APP α és C83 peptidekre. Az esetek mintegy 10%-ban viszont az APP fehérjét a β -szekretáz (BACE) hasítja APP β és C99 peptidekre, ez utóbbit a γ -szekretáz (presenilin komplex) tovább hasítja, és egy erősen neurotoxikus termék, az A β peptid [1-42] keletkezik. Kóros körülmények hatására erőteljesen megnövekszik a β - és γ -szekretáz aktivitás, amelynek eredményeképpen nagymennyiségben termelődik a káros A β peptid. A mutáns transzgén hatására az egértörzsben Alzheimer-kórra jellemző elváltozások alakulnak ki, mint például amiloid lerakódások, axon-degeneráció illetve a szinapszisok számának csökkenése, a tanulási képességek és a memória gyengülése (<http://jaxmice.jax.org/strain/004462.html>). Ezt az egértörzset kereszteztük laboratóriumunkban korábban létrehozott humán Hsp27 fehérjét túltermelő egértörzsszel, így egy olyan új, többszörösen transzgenikus egértörzset állítottunk elő, amelyen lehetőségünk nyílt tanulmányozni a Hsp27 szerepét az Alzheimer-kór kialakulása, kórfejlődése során.

Számos tanulmány szerint a szolubilis A β oligomerek gátolhatják a hosszútávú szinaptikus plaszticitást, és befolyásolhatják a tanulás képességét (Haas és Selkoe 2007). Kísérleteink során ezért először a térbeli tanulást és memóriát vizsgáltuk a Barnes-féle labirintus és Morris-féle vízilabirintus tesztekkel. A várakozásnak megfelelően az AD modell állatokban (APPswe/PS1dE9) csökkent a térbeli tanulás képessége, a vad típusú állatokhoz képest hosszabb időbe telt, mire megtalálták a menekülő dobozt, illetve a platformot. Az APPswe/PS1dE9/Hsp27 csoport teljesítménye viszont hasonló volt a vad típushoz, amiből arra következtethetünk, hogy a Hsp27 fehérje túltermelése csökkenti a tanulásban, memóriában bekövetkező zavarokat.

A viselkedési tesztek után a hosszútávú szinaptikus plaszticitást is vizsgáltuk, ami a tanulás celluláris mechanizmusának egyik legelterjedtebb modellje. Eredményeink azt mutatják, hogy az APPswe/PS1dE9 egereknél károsodott a hosszútávú szinaptikus plaszticitás, de ezt a Hsp27 fokozott expressziója helyreállítja. Az AD modell egerekben az idegi hálózat serkentetősége is megnövekedett, ami egybe vág a szakirodalomban fellelhető adatokkal, ugyanis ismert, hogy az idősebb AD modell egerek hajlamosabbak epilepsziás

rohamokra (Palop és mtsai. 2007, Westmark és mtsai, 2008, Minkeviciene és mtsai. 2009, Vogt és mtsai, 2009). Ezzel szemben a Hsp27 túltermelő AD modell törzsben ez a megnövekedett serkentetőség nem volt tapasztalható.

Annak ellenére, hogy egyre több eredmény azt sugallja, hogy a nagy A β aggregátumok közömbösek, vagy akár védő hatásúak is lehetnek a sejtekre nézve, meg kell említeni, hogy a fibrillumokból álló plakkok körül megfigyelhetők károsodott idegsejtek, amiből arra következtethetünk, hogy az oldhatatlan aggregátumok is károsak az idegsejtekre nézve. A probléma az, hogy a nagy aggregátumok körül előfordulhatnak kisebb, diffúzibilis partikulumok, például oligomerek (Haas és Selkoe 2007). Ennek fényében nehéz eldönteni, hogy a nagy, oldhatatlan aggregátumok vagy a kisebb, szolubilis oligomerek felelősek az idegsejtek pusztulásáért. Kísérleteink során megvizsgáltuk az amiloid plakkok mennyiségét a transzgenikus állatok agyában, és azt tapasztaltuk, hogy az APP^{swe}/PS1^{dE9}/Hsp27 egerek agyában jelentősen kevesebb plakk számolható meg, mint az APP^{swe}/PS1^{dE9} egerek esetében. Ebből a kísérletből azonban nem derül ki, hogy az alacsonyabb amiloid plakk szám az A β peptid fokozott lebontásának és eltávolításának (clearance) a következménye, vagy eleve kevesebb A β peptid keletkezett a Hsp27 fehérjét túltermelő törzsben, esetleg az A β oligomerizációját és aggregációját befolyásolja a Hsp27. Habár több tanulmány kimutatta a chaperonok védő hatását különböző neurodegeneratív betegségek állatmodelljében, a védelem molekuláris mechanizmusa még nem teljesen ismert. A stresszfehérjék valószínűleg több ponton hatnak. Neuroprotektív hatásaik között szerepel a fehérjék aggregációjának megelőzése, majd az általuk elősegített proteoszómás lebontásnak szerepe lehet a toxikus fehérjék eltávolításában is. Ezen kívül csökkenthetik az oxidatív stressz mértékét, illetve gátolhatják az apoptotikus folyamatokat, ezek szintén hozzájárulhatnak a védő hatásukhoz (Muchowski és Wacker 2005). Kísérleteink során megvizsgáltuk a különböző korú állatok agyában levő elhalt idegsejtek számát is. Azt tapasztaltuk, hogy az életkor előrehaladtával jelentősen nőtt az idegsejtelhalás mértéke a transzgenikus állatokban, és 14 hónapos korban ugyan az elhalt neuronok száma kevesebb volt a Hsp27 túltermelő AD egerekben, de ez a különbség nem volt szignifikáns. Ebből arra következtethetünk, hogy a Hsp27 jelen esetben elsősorban nem az anti-apoptotikus tulajdonsága révén vált ki védő hatást, hanem valószínűleg a betegség egy korábbi fázisában. Elképzelhető, hogy a Hsp27-nek elsősorban az A β peptid felhalmozódásának és aggregációjának gátlásában, illetve az A β fokozott degradációjában és eltávolításában lehet fontos szerepe. Az is valószínű, hogy a stresszfehérjék a szinapszisok működésére is hatással vannak, hiszen több tanulmány is bebizonyította, hogy különböző stresszfehérjék, köztük a Hsp27, hőstresszt követően a

szinapszisokban mutathatók ki (Bechtold és Brown 2000, Bechtold és mtsai. 2000). Ezen kívül a Hsp70-ről és a Hsp27-ről is bebizonyosodott, hogy enyhítik a kémiai kiváltott rángógörcsök és epileptoid rohamok súlyosságát (Akbar és mtsai. 2003, Ekimova és mtsai. 2010).

Az A β peptid által indukált neurotoxicitás molekuláris mechanizmusa sem teljesen ismert még, különböző tanulmányok azt mutatják, hogy ezek a mechanizmusok is sokfélék, a folyamathoz hozzájárul többek között a megváltozott enzimaktivitás, a felborult kalcium homeosztázis és a megnövekedett szabadgyök termelődés (Small és mtsai. 2001). Több bizonyíték utal arra, hogy az A β kölcsönhatásba léphet biológiai membránokkal, megváltoztatva azok fluiditását. Ha az A β megzavarja a membránok szerkezetét, elképzelhető, hogy ez olyan folyamatokat indukál, amelyek végül neuronális diszfunkciókhoz vezetnek. Mivel a membránok destabilizációja befolyásolja a membrán komponenseinek funkcióját, az A β inszerciója egy sor eseményt idézhet elő, mint például a Ca homeosztázis felborulása, szabadgyök képződés, amiket a membránfehérjék konformációjának megváltozása katalizál (Kanfer és mtsai. 1999). Fontos azt is megjegyezni, hogy az APP hasadása is erősen függ a membrán fluiditásától, hiszen a hasítást végző α -, β -, és γ -szekretázok a membránhoz kapcsolódnak. A membrán állapotában bekövetkező fizikai-kémiai változások nagyban befolyásolhatják egyes membrán fehérjék, például az α -, β -, és γ -szekretázok működését. Lehetséges, hogy az A β serkenti az APP hasítását azáltal, hogy csökkenti a membrán fluiditását, ami pedig további A β termelődéshez vezet (Peters és mtsai. 2009). Mivel elképzelhető, hogy a Hsp27 is képes kölcsönhatásba lépni a membránokkal és stabilizálni azokat, ezáltal enyhítheti az A β által előidézett, az idegsejtek működését befolyásoló folyamatok hatását, vagy akár csökkentheti az A β termelődésének mértékét.

A reaktív oxigén gyökök (ROS) keletkezése szintén fontos eleme az A β által kiváltott neurotoxikus folyamatoknak. Kimutatták, hogy az A β serkenti a mitokondriális ROS termelését (Behl és mtsai. 1994). Az Alzheimer-kórban szenvedő páciensek agyában abnormálisan magas szintű fehérje, lipid és DNS oxidáció mutatható ki, a szabadgyökök által végzett pusztítás kimagasló a plakkok és neurofibrilláris kötegek környezetében (Mattson 2004). Mivel több tanulmány is kimutatta, hogy a Hsp27 hatékony az oxidatív stresszel szemben, feltételezhetjük, hogy részben ezen tulajdonsága által csökkentheti az A β idegsejteket károsító hatását.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Munkámat az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézetében, az Állatgenetikai és Molekuláris Neurobiológiai csoportban végeztem. Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Sántha Miklósnak a lehetőséget, hogy csoportjában dolgozhattam, valamint hogy munkámat irányította és figyelemmel kísérte. Köszönet Gonda Szilviának a kitartó és sikeres mikroinjektálásért, és Mari Mónikának az állatok genotipizálásáért valamint a laborban nyújtott technikai segítségért. Köszönöm Lénárt Nikolett hasznos tanácsait és gyakorlati segítségét. Köszönettel tartozom továbbá csoportunk minden jelenlegi és régi tagjának a munkám során nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom Penke Botond professzor úrnak, valamint Dr. Szegedi Viktornak és Varga Edinának (SZBK, Biokémia Intézet, Szeged) az elektrofiziológiás vizsgálatok elvégzéséért és az eredmények kiértékeléséért. Borbély Emőkének és Horváth Jánosnak (SZTE, Orvosvegytani intézet, Magatartás labor, Szeged) a Barnes Maze és Morris Water Maze tesztek elvégzésében és kiértékelésében nyújtott segítségét köszönöm.

Hálasan köszönöm Vígh László professzor úrnak a Hsp27 plazmid klón megszerzésében nyújtott segítségét és hasznos tanácsait.

IRODALOMJEGYZÉK

Abdul HM, Calabrese V, Calvani M, Butterfield DA. (2006) Acetyl-L-carnitine-induced up-regulation of heat shock proteins protects cortical neurons against amyloid-beta peptide 1-42-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 84, 398–408.

Akbar MT, Wells DJ, Latchman DS, de Belleruche J. (2001) Heat shock protein 27 shows a distinctive widespread spatial and temporal pattern of induction in CNS glial and neuronal cells compared to heat shock protein 70 and caspase 3 following kainate administration. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 93:148-63.

Akbar MT, Lundberg AM, Liu K, Vidyadaran S, Wells KE, Dolatshad H, Wynn S, Wells DJ, Latchman DS, de Belleruche J. (2003) The neuroprotective effects of heat shock protein 27 overexpression in transgenic animals against kainate-induced seizures and hippocampal cell death. *J. Biol. Chem.* 278:19956-65.

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strommeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 21:383–421.

Allen GV, Chase T. (2001) Induction of heat shock proteins and motor function deficits after focal cerebellar injury. *Neuroscience.* 102:603-14.

An JJ, Lee YP, Kim SY, Lee SH, Lee MJ, Jeong MS, Kim DW, Jang SH, Yoo KY, Won MH, Kang TC, Kwon OS, Cho SW, Lee KS, Park J, Eum WS, Choi SY. (2008) Transduced human PEP-1-heat shock protein 27 efficiently protects against brain ischemic insult. *FEBS J.* 275:1296-1308.

Babu PP, Nagaraju N, Vemuri MC. (1990) Differences in the Plasma Membrane Proteins of Chronic Alcoholic Rat Brain Membr. *Biochem.* 9:227-37.

Babu PP and Vemuri MC. (1990) Liver plasma membrane proteins in chronic ethanol intoxication. *Biochem. Int.* 20:573-77.

Baker RC, Kramer RE. (1999) Cytotoxicity of short-chain alcohols. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 39:127-50. Review

Balogh G, Horváth I, Nagy E, Hoyk Z, Benkő S, Bensaude O, Vigh L. (2005) The hyperfluidization of mammalian cell membranes acts as a signal to initiate the heat shock protein response. *FEBS. J.* 272:6077-6086

Bechtold DA, Brown IR. (2000) Heat shock proteins Hsp27 and Hsp32 localize to synaptic sites in the rat cerebellum following hyperthermia. *Brain Res Mol Brain Res.* 75:309-20.

Bechtold DA, Rush SJ, Brown IR. (2000) Localization of the heat-shock protein Hsp70 to the synapse following hyperthermic stress in the brain. *J. Neurochem.* 74:641-6

Beck FX, Neuhofer W, Muller E. (2000) Molecular chaperones in the kidney: distribution, putative roles, and regulation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 279:F203-F215.

Becker J, Craig E.A. (1994) Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Biochem.* 219:11–23.

Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, Laferla FM. (2005) Intraneuronal Aβ causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron.* 45:675–688.

Calabrese, V., Renis, M., Calderone, A., Russo, A., Barcellona, M. L., and Rizza, V. (1996). Stress proteins and SH-groups in oxidant-induced cell damage after acute ethanol administration in rat. *Free Radic. Biol. Med.* 20:391–398.

Calabrese, V., Renis, M., Calderone, A., Russo, A., Reale, S., Barcellona, M. L., and Rizza, V. (1998). Stress proteins and SH-groups in oxidant-induced cellular injury after chronic ethanol administration in rat. *Free Radic. Biol. Med.* 24:1159–1167.

Calabrese V, Stella AM, Butterfield DA, Scapagnini G. (2004) Redox regulation in neurodegeneration and longevity: role of the heme oxygenase and HSP70 systems in brain stress tolerance. *Antioxid. Redox Signal.* 6, 895–913.

Choleris E, Thomas AW, Kavaliers M, Prato FS. (2001) A detailed ethological analysis of the mouse openfieldtest: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neurosci Biobehav Rev.* 25:235-260.

Chui DH, Tanahashi H, Ozawa K, Ikeda S, Checler F, Ueda O, Suzuki H, Araki W, Inoue H, Shirotani K, Takahashi K, Gallyas F, Tabira T. (1999) Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nature Med.* 5, 560–564.

Cobb BA, Petrash JM. (2000) Characterization of alpha-crystallin-plasma membrane binding. *J. Biol. Chem.* 275:6664-6672.

Coucheney F, Gal L, Beney L, Lherminier J, Gervais P, Guzzo J. (2005) A small HSP, Lo18, interacts with the cell membrane and modulates lipid physical state under heat shock conditions in a lactic acid bacterium. *Biochim. Biophys. Acta.* 1720:92-98.

Crabbe JC, Metten P, CH, Schlumbohm JP, Cameron AJ, Wahlsten D. (2003) Genotypic differences in ethanol sensitivity in two tests of motor incoordination *J Appl Physiol* 95: 1338–1351

Davis-Salinas J, Van Nostrand WE. (1995) Amyloid beta-protein aggregation nullifies its pathologic properties in cultured cerebrovascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 270:20887–20890.

de Jong WW, Caspers GJ, Leunissen JAM. (1998) Genealogy of the alpha-crystallin-small heat-shock protein superfamily *Int. J. Biol. Macromolecules* 22:151–162.

Ekimova IV, Nitsinskaya LE, Romanova IV, Pastukhov YF, Margulis BA, Guzhova IV. (2010) Exogenous protein Hsp70/Hsc70 can penetrate into brain structures and attenuate the severity of chemically-induced seizures. *J. Neurochem.* 115:1035-44.

Ellis RJ. (1990) The molecular chaperone concept. *Semin. Cell. Biol.* 1:1-9. Review.

Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, Hebert LE, Hennekens CH, Taylor JO. (1989) Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA.* 262:2551-2556.

Evans CG, Wisen S, Gestwicki JE. (2006) Heat shock proteins 70 and 90 inhibit early stages of amyloid beta-(1-42) aggregation in vitro. *J. Biol. Chem.* 281:33182–33191.

Fadda F, Rossetti ZL. (1998) Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.* 56:385-431.

Ficker E, Dennis AT, Wang L, Brown AM (2003) Role of the cytosolic chaperones Hsp70 and Hsp90 in maturation of the cardiac potassium channel HERG. *Circ. Res.* 92:e87-100.

Fujimoto M, Hayashida N, Katoh T, Oshima K, Shinkawa T, Prakasam R, Tan K, Inouye S, Takii R, Nakai A. (2010) A novel mouse HSF3 has the potential to activate nonclassical heat-shock genes during heat shock. *Mol. Biol. Cell.* 21:106-16.

Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin VI, Sherman MY. (1998) Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J. Biol. Chem.* 272:18033-18037

Garrido C, Bruey J-M, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Solary E. (1999) Hsp27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J.* 13:2061-2070.

Glabe CC. (2005) Amyloid accumulation and pathogenesis of Alzheimer's disease: significance of monomeric, oligomeric and fibrillar Aβ. *Subcell.Biochem.* 38:167–177.

Glenner GG, Wong CW. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120:885–890.

Goldstein DB, Chin JH. (1981) Interaction of ethanol with biological membranes. *Fed. Proc.* 40:2073-6.

Haass C, Selkoe DJ. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8:101–112.

Halliwel B. (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* 97:1634-58. Review

Hardy J, Selkoe DJ. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353–356.

Harrison FE, Hosseini AH, McDonald MP. (2009) Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav. Brain. Res.* 198:247-251.

He H, Soncin F, Grammatikakis N, Li Y, Siganou A, Gong J, Brown SA, Kingston RE, Calderwood SK. (2003) Elevated expression of heat shock factor (HSF) 2A stimulates HSF1-induced transcription during stress. *J. Biol. Chem.* 278:35465-75.

Hollander JM, Martin JL, Belke DD, Scott BT, Swanson E, Krishnamoorthy V, Dillmann WH. (2004) Overexpression of Wild-Type Heat Shock Protein 27 and a Nonphosphorylatable Heat Shock Protein 27 Mutant Protects Against Ischemia/Reperfusion Injury in a Transgenic Mouse Model. *Circulation.* 110:3544-52.

Horvath I, Multhoff G, Sonnleitner A, Vigh L. (2008) Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones. *Biochim. Biophys. Acta.* 1778:1653-1664.

Hoshino T, Murao N, Namba T, Takehara M, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Matsushima T, Suzuki T, Mizushima T. (2011) Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by expression of heat shock protein 70 in mice. *J. Neurosci.*, 31:5225–5234

Jakobsen BK, Pelham HRB. (1988) Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 8:5040-5042

Jobin MP, Delmas F, Garmyn D, Divie`s C, Guzzo J. (1997) Molecular characterization of the gene encoding an 18-kilodalton small heat shock protein associated with the membrane of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:609–614.

Kalmar B, Greensmith L. (2009) Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61:310–318.

Kanfer JN, Sorrentino G, Sitar DS (1999) Amiloid Beta Peptide Membrane Perturbation Is the Basis for its Biological Effects *Neurochemical Research*, Vol. 24, No. 12,, pp. 1621-1630

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amiloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* 325:733–736.

Kappe G, Franck E, Verschuure P, Boelens WC, Leunissen JA, de Jong WW. (2003) The human genome encodes 10 a-crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10. *Cell. Stress. Chaperones.* 8:53-61.

Kashlan OB, Mueller GM, Qamar MZ, Poland PA, Ahner A, Rubenstein RC, Hughey RP, Brodsky JL, Kleyman TR. (2007) Small heat shock protein alphaA-crystallin regulates epithelial sodium channel expression. *J. Biol. Chem.* 282:28149-28156

Kato H, Liu Y, Kogure K, Kato K. (1994) Induction of 27-kDa heat shock protein following cerebral ischemia in a rat model of ischemic tolerance. *Brain. Res.* 634:235-244

Katsuno M, Sang C, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. (2005) Pharmacological induction of heat-shock proteins alleviates polyglutamine-mediated motor neuron disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102:16801–16806.

Katzman R, Terry R, DeTeresa R, Brown T, Davies P, Fuld P, Rening X, Peck A. (1988) Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann. Neurol.* 23:138–144.

Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG. (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science.* 300:486–489.

Kennard JA, Woodruff-Pak DS. (2011) Age sensitivity of behavioral tests and brain substrates of normal aging in mice *Front. Aging. Neurosci.* 3:9.

Krieger A, Radhakrishnan K, Pereverzev A, Siapich SA, Banat M, Kamp MA, Leroy J, Klöckner U, Hescheler J, Weiergräber M, Schneider T. (2006) The molecular chaperone hsp70 interacts with the cytosolic II-III loop of the Cav2.3 E-type voltage-gated Ca²⁺ channel. *Cell. Physiol. Biochem.* 17:97-110.

Krueger-Naug AM, Hopkins DA, Armstrong JN, Plumier JC, Currie RW. (2000) Hyperthermic induction of the 27-kDa heat shock protein (Hsp27) in neuroglia and neurons of the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 428:495-510.

Kumar-Singh S, Dewachter I, Moechars D, Lübke U, De Jonghe C, Ceuterick C, Checler F, Naidu A, Cordell B, Cras P, Van Broeckhoven C, Van Leuven F. (2000) Behavioral disturbances without amyloid deposits in mice overexpressing human amyloid precursor protein with Flemish (A692G) or Dutch (E693Q) mutation. *Neurobiol. Dis.* 7:9–22.

Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH. (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature.* 440:352–357.

Li GC, Werb Z. (1982) Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblast. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 79:3218-3222.

Lo Bianco C, Shorter J, Re'gulier E, Lashuel H, Iwatsubo T, Lindquist S, Aebischer P. (2008) Hsp104 antagonizes alpha-synuclein aggregation and reduces dopaminergic degeneration in a rat model of Parkinson disease. *J. Clin. Invest.* 118:3087–3097.

Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J. (1999) Soluble amyloid β peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 155:853–862.

Magrane' J, Smith RC, Walsh K, Querfurth HW. (2004) Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed β -amyloid in neurons. *J. Neurosci.* 24:1700–1706.

Mantis NJ, Winans SC. (1992) Characterization of the *Agrobacterium tumefaciens* heat shock response: evidence for a σ ₃₂-like sigma factor. *J. Bacteriol.* 174:991–997.

Mason RP, Walter MF, Mason PE. (1997) Effect of oxidative stress on membrane structure: small-angle X-ray diffraction analysis. *Free. Radic. Biol. Med.* 23:419–425

Matchett JA, Erickson CK. (1977) Alteration of ethanol-induced changes in locomotor activity by adrenergic blockers in mice. *Psychopharmacology*. 52:201–206

Mattson MP. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*. 430:631-639. Review.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 34:939-44.

McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL. (1999) Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol*. 46:860–866.

Mehlen P, Schulze-Osthoff K, Arrigo AP. (1996) Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J. Biol. Chem*. 271:16510-16514

Minkeviciene R, Rheims S, Dobszay MB, Zilberter M, Hartikainen J, Fülöp L, Penke B, Zilberter Y, Harkany T, Pitkänen A, Tanila H. (2009) Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy *J. Neurosci*. 29:3453–3462

Mizushima T, Tsutsumi S, Rokutan K, Tsuchiya T. (1999) Suppression of Ethanol-Induced Apoptotic DNA Fragmentation by Geranylgeranylacetone in Cultured Guinea Pig Gastric Mucosal Cells. *Dig. Dis. Sci*. 44:510-4.

Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reversé D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van Leuven F. (1999) Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J. Biol. Chem*. 274:6483–6492.

Monji A, Utsumi H, Ueda T, Imoto T, Yoshida I, Hashioka S, Tashiro K, Tashiro N. (2001) The relationship between the aggregational state of the amyloid-beta peptides and free radical generation by the peptides. *J. Neurochem*. 77:1425-1432.

Morimoto RI, Sarge KD, Abravaya K. (1992). Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. *J. Biol. Chem*. 267:21987-90. Review.

Morris RGM. (1981) Spatial Localization Does Not Require the Presence of Local Cues. *Learning and Motivation*. 12:239-260

Muchowski PJ, Wacker JL. (2005) Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat. Rev. Neurosci*. 6:11–22.

Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlough L. (2000) High-level neuronal expression of A β 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci*. 20:4050-4058.

Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, Buxbaum JD. (2000) Correlation between elevated levels of amyloid β -peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 283:1571–1577.

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. (2003) *Neuron* 39:409–421.

Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, Yoo J, Ho KO, Yu GQ, Kreitzer A, Finkbeiner S, Noebels JL, Mucke L. (2007) Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease *Neuron*. 55:697–671

Pandey M, Varghese M, Sindhu KM, Sreetama S, Navneet AK, Mohanakumar KP, Usha R (2008) Mitochondrial NAD-linked State 3 respiration and complex-I activity are compromised in the cerebral cortex of 3-nitropropionic acid-induced rat model of Huntington's disease. *J. of Neurochem.* 104:420-434

Perez N, Sugar J, Charya S, Johnson G, Merrill C, Bierer L, Perl D, Haroutunian V, Wallace W. (1991) Increased synthesis and accumulation of heat shock 70 proteins in Alzheimer's disease. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 11:249–254.

Peters I, Igbavboa U, Schütt T, Haidari S, Hartig U, Böttner S, Copanaki E, Deller T, Kögel D, W. Wood WG, Müller WE, Eckert GP. (2009) The interaction of beta-amyloid protein with cellular membranes stimulates its own production. *Biochim. Biophys. Acta.* 1788:964–972.

Pignataro L, Miller AN, Ma L, Midha S, Protiva P, Herrera DG, Harrison NL. (2007) Alcohol Regulates Gene Expression in Neurons via Activation of Heat Shock Factor 1. *J. Neurosci.* 27:12957-12966.

Piper PW. (1995) The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol. Lett.* 134:121–127.

Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L. (2005) Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res.* 1035:24-31

Selkoe DJ. (2002) Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure. *Science* 298. 5594. 789-791

Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. (2011) Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1:a006189

Sergeant O, Pereira M, Belhomme C, Chevanne M, Huc L, Lagadic-Gossmann D. (2005) Role for membrane fluidity in ethanol-induced oxidative stress of primary rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313:104-11.

Shimura H, Miura-Shimura Y, Kosik KS. (2004) Binding of tau to heat shock protein 27 leads to decreased concentration of hyperphosphorylated tau and enhanced cell survival. *J. Biol. Chem.* 279:17957–17962.

Sills RC, Valentine WM, Moser V, Graham DG, Morgan DL. (2000) Characterization of Carbon Disulfide Neurotoxicity in C57BL6 Mice: Behavioral, Morphologic, and Molecular Effects. *Toxicol. Pathol.* 28:142-8.

Small DH, Mok SS, Bornstein JC (2001) Alzheimer's disease and A β toxicity: from top to bottom. *Nature Reviews Neuroscience* 2:595-598.

Smoothy R, Berry MS. (1984) Alcohol increases both locomotion and immobility in mice: an ethological analysis of spontaneous motor activity. *Psychopharmacology.* 83:272–276.

Somasundaram T, Bhat SP.(2000) Canonical heat shock element in the α B-crystallin gene shows tissue-specific and developmentally controlled interactions with heat shock factor. *J. Biol. Chem* 275:17154–17159.

Sőti C, Csermely P. (2003) Aging and molecular chaperones. *Exp Gerontol.* 38:1037-1040.

Sun GY, Xia J, Draczynska-Lusiak B, Simonyi A, Sun AY. (1999) Grape polyphenols protect neurodegenerative changes induced by chronic ethanol administration. *Neuroreport* 10:93-96.

Sun H-Q, Kwiatkowska K, Yin HL. (1995) Actin monomer binding proteins. *Curr. Op. Cell Biol.* 7:102-110.

Sun Y, MacRae TH. (2005) The small heat shock proteins and their role in human disease *FEBS Journal* 272:2613–2627

Tanabe M, Sasai N, Nagata K, Liu XD, Liu PC, Thiele DJ, Nakai A. (1999) The mammalian HSF4 gene generates both an activator and a repressor of heat shock genes by alternative splicing. *J. Biol. Chem* 274:27845–27856

Toth ME, Gonda S, Vigh L, Santha M. (2010) Neuroprotective effect of small heat shock protein, Hsp27, after acute and chronic alcohol administration. *Cell Stress Chaperones.* 15:807-817.

Török Z, Goloubinoff P, Horváth I, Tsvetkova NM, Glatz A, Balogh G, Varvasovszki V, Los DA, Vierling E, Crowe JH, Vigh L. (2000) Synechocystis HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3098-3103.

Török Z, Horváth I, Goloubinoff P, Kovács E, Glatz A, Balogh G, Vigh L. (1997) Evidence for a lipochaperonin: association of active protein-folding GroESL oligomers with lipids can stabilize membranes under heat shock conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 18:2192-2197.

Tsvetkova NM, Horváth I, Török Z, Wolkers WF, Balogi Z, Shigapova N, Crowe LM, Tablin F, Vierling E, Crowe JH, Vigh L. (2002) Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13504-13509.

Vogt DL, Thomas D, Galvan V, Bredesen DE, Lamb BT, Pimplikar SW. (2009) Abnormal neuronal networks and seizure susceptibility in mice overexpressing the APP intracellular domain. *Neurobiol. Aging* 32:1725-1729.

Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*. 416:535–539.

Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM, Lomakin A, Benedek GB, Selkoe DJ, Teplow DB. (1999) Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J. Biol. Chem.* 274:25945–25952.

Westmark CJ, Westmark PR, Beard AM, Hildebrandt SM, Malter JS. (2008) Seizure susceptibility and mortality in mice that over-express amyloid precursor protein. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 1:157–168

Wilhelmus MM, Boelens WC, Otte-Höller I, Kamps B, de Waal RM, Verbeek MM. (2006). Small heat shock proteins inhibit amyloid-beta protein aggregation and cerebrovascular amyloid-beta protein toxicity. *Brain Res.* 1089:67-78.

Wyss-Coray T, Mucke L. (2002) Inflammation in neurodegenerative disease-a double-edged sword. *Neuron*. 35:419–432.

Wytenbach A, Sauvageot O, Carmichael J, Diaz-Latoud C, Arrigo AP, Rubinsztein DC. (2002) Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. *Hum. Mol. Genet.* 11:1137-1151.

Yamamoto H, Yamamoto Y, Yamagami K, Kume M, Kimoto S, Toyokuni S, Uchida K, Fukumoto M, Yamaoka Y. (2000) Heat-shock preconditioning reduces oxidative protein denaturation and ameliorates liver injury by carbon tetrachloride in rats. *Res. Exp. Med.* 199:309–318.

Yeo M, Kim DK, Cho SW, Hong HD. (2008) Ginseng, the root of *Panax ginseng* protects ethanol-induced gastric damages in rat through the induction of cytoprotective heat-shock protein 27. *Dig. Dis. Sci.* 53:606-613.

A DOLGOZAT ÖSSZEFOGLALÁSA

Bevezetés

A stresszfehérjék, másnéven hősokkfehérjék az élővilágban általánosan elterjedt, evolúciósan konzervált fehérjék, melyek az úgynevezett *chaperon* fehérjék családjába tartoznak. Stressz hatására nagyon gyorsan indukálódnak, hiszen egyik legfontosabb feladatuk a sejtek védelme a stressz hatásokkal szemben. A Hsp27 egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy képes hozzákötődni a hibás szerkezetű, instabil fehérjékhez, ezáltal megakadályozza, hogy azok egymással kapcsolódva aggregátumokat képezzenek, ezzel együtt biztosítja annak lehetőségét, hogy térszerkezetük a későbbiekben helyreálljon. A kismolsúlyú hősokkfehérjéknek ezen kívül anti-apoptotikus és antioxidáns tulajdonságai is vannak, a membránok működésében és védelmében is szerepet játszanak, valamint a sejtvezetékhez kapcsolódva stabilizálhatják azt. Megfigyelték, hogy a stresszfehérjék, köztük a Hsp27 neuroprotektív szerepet töltenek be a legkülönbözőbb idegrendszert károsító hatásokkal szemben. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a stresszfehérjék expressziója megnő az agyban a szervezetet ért különböző stresszhatásokra, többek között neurodegeneratív betegségek során, illetve mind akut mind krónikus etanol fogyasztás hatására.

Az Alzheimer-kór az egyik leggyakoribb neurodegeneratív betegség, jellemző tünetei a memória és a kognitív funkciók folyamatos romlása, amiloid plakk képződés, neurofibrilláris kötegek kialakulása, szabadgyökök keletkezése, a neuronok metabolikus homeosztázisának felborulása, végül az idegsejtek pusztulása. A plakkok fő alkotóeleme az A β peptid, egy 4 kDa nagyságú polipeptid, ami az amiloid prekursor proteinből (APP) keletkezik β - és γ -szekretázok proteolitikus hasítása által. A keletkező A β peptidok különböző nagyságú aggregátumokat alakítanak ki, melyek központi szerepet játszanak az Alzheimer-kór tüneteinek kialakulásában, így a sejtek azon elemei, melyek részt vesznek az amiloid termelődésében, lebontásában vagy oligomerizációjában, jó célpontok lehetnek olyan szerek kifejlesztése során, amelyek az Alzheimer-kór megelőzését célozzák.

Az alkoholfogyasztás gyakorlatilag az összes szervre hatással van, köztük az agy működésére is. Az etanol számos citotoxikus hatással rendelkezik, melyek nagy része sejtípustól független. Az etanol többek között befolyásolja a membránlipidek állapotát, denaturálja a fehérjéket, hatására megemelkedik a reaktív oxigén gyökök termelődése, ami a sejtalkotók további vezethet. Ugyanakkor az akut vagy krónikus etanol kezelés, hasonlóan

más káros hatásokhoz, aktiválja a hősokkfehérjék termelődését, ezért feltételezhető, hogy a stresszfehérjék etanol kezelés során is védelmet biztosítanak.

Célkitűzések

Munkánk első részében arra kerestük a választ, hogy a Hsp27 rendelkezik-e neuroprotektív hatással akut illetve krónikus etanol kezelést követően. A következőkben pedig azt vizsgáltuk, hogy a Hsp27 termelődése lassítja-e az Alzheimer-kór tüneteinek kialakulását transzgenikus egerekben.

Eredmények

1. Munkánk során előállítottuk a humán Hsp27 fehérjét túltermelő transzgenikus egértörzset. Western blot analízissel meghatároztuk a transzgén kifejeződését az agyban. A Hsp27 fehérje eloszlását a különböző agyrégiókban Western blot analízissel és immunhisztokémiai festéssel követtük nyomon.
2. Akut etanol kezelés után viselkedési tesztekkel mutattuk ki, hogy a Hsp27 fehérje túltermelésének védő hatása van az etanol egyensúlyt és mozgáskoordinációt károsító tulajdonságával szemben.
3. Krónikus etanol kezelés után Fluoro-JadeC festéssel kimutattuk, hogy a Hsp27 fehérje védő hatást fejt ki az etanol által kiváltott idegsejt pusztulással szemben.
4. A Hsp27 túltermelő törzset az Alzheimer-kór validált állatmodelljével összekeresztelve előállítottunk egy többszörösen transzgenikus egértörzset (APPswe/PS1dE9/Hsp27), amelynek segítségével azt vizsgáltuk, hogy a Hsp27 képes-e lassítani az Alzheimer-kór tüneteinek kialakulását.
5. Magatartás tesztekkel vizsgáltuk a transzgenikus állatok memóriáját, tanulási képességeit, és kimutattuk, hogy a Hsp27 hatására javult az AD modell állatok tanulási képessége.
6. Az elektrofiziológias vizsgálatokkal kimutattuk, hogy az AD modell állatoknál nem jól működik a hosszútávú szinaptikus plaszticitás, valamint az idegi hálózat serkentetősége is megnövekedik, de ezt a Hsp27 túltermelése helyreállítja.
7. Az amiloid plakkok immunhisztokémiai festésével kimutattuk, hogy Hsp27 fehérjét túltermelő AD modell állatok különböző agyrégióiban (agykéreg, hippocampusz) szignifikánsan kevesebb plakk mutatható ki, mint az AD modell állatok agyában.
8. Az elhalt idegsejteket aktivált kaszpáz-3 immunfestéssel és Fluoro-JadeC festéssel tettük láthatóvá. Megállapítottuk, hogy az idegsejt pusztulás mértéke jelentősen megnőtt az életkor előrehaladtával, és 14 hónapos korban ugyan az elhalt neuronok száma kevesebb volt a Hsp27 túltermelő AD egerekben, de ez a különbség nem volt szignifikáns.

Eredmények megvitatása

Eredményeink, összhangban a szakirodalomban fellelhető adatokkal, azt mutatják, hogy a Hsp27 neuroprotektív hatással rendelkezik. Kísérleteink során megfigyeltük, hogy a Hsp27 túltermelése megvédi az idegsejteket az akut és krónikus etanol kezelés káros hatásaival szemben, illetve lassítja az Alzheimer-kór tüneteinek kialakulását a validált AD állatmodellben.

Az etanol idegrendszerre kifejtett hatása rendkívül komplex. Egyrészt közvetlenül kapcsolódik egyes membránfehérjék specifikus régióihoz ezáltal konformációváltozást okozva a fehérjék szerkezetében, ami végül kihat azok funkciójára. Másrészt akut etanol kezelés hatására nő a membránok rendezetlensége és fluiditása, ami viszont hatással van a receptorok és ioncsatornák működésére. Mivel több tanulmány szerint a stresszfehérjék hatással vannak a membrán működésére és fontos szerepük lehet a membrán védelmében stressz körülmények között, ezen irodalmi adatok és a saját eredményeink ismeretében arra következtethetünk, hogy a Hsp27 védelmet biztosíthat az akut etanol kezelés membrán és membrán fehérje károsító hatásaival szemben. Krónikus etanol kezelés során a megnövekedett oxidatív stressznek valószínűleg fontos szerepe van az idegsejtek károsításában, de az alultápláltság, különböző vitaminok hiánya, és más szervek (pl. a máj) károsodása is hozzájárul a neurodegeneratív folyamatok kialakulásához. Több tanulmány is igazolja, Hsp27 képes megvédeni a sejteket az oxidatív stresszel szemben azáltal, hogy csökkenti a reaktív oxigén gyökök (ROS) szintjét, így feltételezhetjük, hogy az általunk kapott eredmények legalább részben a Hsp27 oxidatív stresszel szembeni védő hatásának köszönhetőek.

Az Alzheimer-kór korai tünetei között szerepel a rövidtávú memória károsodása. Ismert, hogy a szolubilis A β oligomerek gátolhatják a hosszútávú szinaptikus plaszticitást, és befolyásolhatják a tanulás képességét. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a várakozásnak megfelelően az AD modell állatok esetében csökkent a térbeli tanulás képessége, valamint károsodott a hosszútávú szinaptikus plaszticitás, és megnövekedett az idegi hálózat serkenthetősége, de ezeket az elváltozásokat a Hsp27 expressziója csökkenti illetve helyreállítja. Ezen túlmenően megfigyeltük, hogy a Hsp27 túltermelő egerek agyában jelentősen kevesebb amiloid plakk számolható meg, mint az AD modell állatok esetében. Ebből a kísérletből azonban nem derül ki, hogy az alacsonyabb amiloid plakk szám az A β peptid fokozott lebontásának és eltávolításának (clearance) a következménye, vagy eleve kevesebb A β peptid keletkezett a Hsp27 fehérjét túltermelő törzsben, illetve a Hsp27 az A β oligomerizációját és aggregációját befolyásolta. Az A β által indukált neurotoxicitás molekuláris mechanizmusa nem teljesen ismert. Több bizonyíték utal arra, hogy az A β

kölcsönhatásba léphet biológiai membránokkal, megváltoztatva azok fluiditását. Ha az A β megzavarja a membrán szerkezetét, elképzelhető, hogy innen indulnak ki azok a folyamatok, amik az A β által kiváltott neurotoxicitáshoz vezetnek. Mivel elképzelhető, hogy a Hsp27 is képes kölcsönhatásba lépni a membránokkal és stabilizálni azokat, ezáltal enyhítheti az A β által előidézett, az idegsejtek működését befolyásoló folyamatok hatását, vagy akár csökkentheti az A β termelődésének mértékét. A reaktív oxigén gyökök keletkezése szintén fontos eleme az A β által kiváltott neurotoxikus folyamatoknak. Mivel több tanulmány is kimutatta, hogy a Hsp27 hatékony az oxidatív stresszel szemben, feltételezhetjük, hogy részben ezen tulajdonsága által csökkentheti az A β idegsejteket károsító hatását.

SUMMARY OF THE THESIS

Introduction

Heat shock proteins are ubiquitously expressed evolutionary conserved proteins which are critical regulators of cellular homeostasis. They are rapidly induced in response to stressors and their most important function is to protect cells against various cellular stresses. Hsp27 belongs to the small heat shock protein family, which are ATP-independent chaperones. Most important function of Hsp27 is that it can bind to non-native proteins, inhibit the aggregation of incorrectly folded proteins, and maintain them in a refolding-competent state. Moreover, it also has anti-apoptotic and antioxidant activities, and it binds to the actin cytoskeleton and stabilizes it. Several studies suggest that heat shock proteins and Hsp27 have neuroprotective functions against different brain damaging effects. It was shown that the expression of heat shock proteins is elevated due to different stress factors, for example in neurodegenerative diseases, or after acute or chronic ethanol treatment.

Alzheimer's disease (AD) is one of the most common neurodegenerative diseases which prevalence is strongly correlated with aging. Alzheimer's disease is characterized by progressive loss of memory and cognitive functions, senile plaque deposition, formation of neurofibrillary tangles, induction of reactive oxygen species and neuronal cell death. The major component of senile plaques is the amyloid- β protein ($A\beta$) which is a 4 kDa polypeptide and it is generated from the amyloid precursor protein (APP) by proteolytic cleavage of β - and γ -secretases. Conformational changes of soluble $A\beta$ may lead to aggregation into oligomers, protofibrils and mature fibrils. $A\beta$ aggregation may cause neurodegeneration through multiple pathways, therefore cellular factors that affect the production, clearance, and oligomerization of $A\beta$ may be good targets for the development of drugs to prevent AD.

Ethanol affects actually all body organs including brain. Ethanol has several cytotoxic effects and most of them are independent of cell type. The interaction of ethanol with membranes causes a decreased membrane order, increased membrane fluidity. It can also interact directly with membrane proteins causing conformational changes thus influencing their function. The increase of oxidative stress may be also involved in neurodegenerative action of ethanol. At the same time ethanol treatment, like other stress factors, has a Hsp inducing effect, which suggest that stress proteins might have protective functions against the harmful effects of ethanol treatment.

Aim of the study

The aim of our studies was a) to investigate the neuroprotective effect of Hsp27 protein after acute and chronic ethanol administration, and b) to study the effect of the small heat shock protein Hsp27 on A β accumulation and related pathological features of Alzheimer's disease.

Results

1.) In our lab we generated a transgenic mouse line overexpressing the human Hsp27 protein. Transgene product was detected using Western blot analysis. To monitor the distribution of Hsp27 in the brain, Western blot and immunohistochemical analysis were used.

2.) After acute ethanol administration behavioral tests were performed to monitor motor coordination, imbalance and ataxia. We found that after ethanol treatment wild-type mice had impaired motor coordination, while Hsp27 overexpressing mice performed better in the behaviour tests.

3.) After chronic ethanol treatment brain sections of mice were stained with Fluoro-JadeC staining. We found significantly lesser amount of degenerated neurons in the brain of ethanol-treated transgenic mice compared to wild type mice.

4.) In order to study the protective role of Hsp27 during the development of Alzheimer's disease we crossed Hsp27 transgenic mice with APPswe/PS1dE9 mice, which is the validated model of Alzheimer's disease.

5.) Spatial learning and memory were tested using Barnes maze and Morris water maze. In both tests we found that the spatial learning of APPswe/PS1dE9 mice was impaired, in contrast, wild type and APPswe/PS1dE9/Hsp27 mice learned to find the escape hole or platform during the training period as indicated by the progressive reduction in escape latency.

6.) Amyloid plaque formation was studied using A β immunostaining on frozen sections. Numerous plaque-depositions were observed in the brain of APPswe/PS1dE9/Hsp27 transgenic animals, however the number of the plaques was significantly less than in the APPswe/PS1dE9 group.

7.) To monitor neuronal apoptosis in 7 and 14 months old transgenic mice, caspase 3 immunostaining and Fluoro-JadeC staining were used. The number of degenerated neurons was markedly increased during aging. In 14 months old, Hsp27 overexpressing mice we

found slightly decreased number of degenerated neurons compared to AD model mice, but the difference was not significant.

8.) Electrophysiological recordings revealed that the excitability of neurons was significantly increased and long term potentiation was impaired in the APPswe/PS1dE9 group, but this was rescued in the APPswe/PS1dE9/Hsp27 mice.

Discussion

Our data are in strong agreement with earlier findings and show that Hsp27 has neuroprotective effect, indeed. We found that Hsp27 can protect neurons against the acute and chronic toxic effects of ethanol and also can ameliorate symptoms of Alzheimer's disease.

Ethanol has a very complex effect in nervous system. Alcohol can directly interact with membrane proteins at specific sites on each protein producing conformational changes thus influencing their function. Acute administration of ethanol can increase membrane disorder by hyperfluidizing the membrane, which in turn has an effect on receptors and ion channel functions. Several studies have demonstrated that there is a potential link between heat-shock proteins and membrane function, as Hsps can bind to membranes, increase its physical order and stabilize the membrane under stress conditions, which suggest that Hsp27 might has a membrane and membrane protein protecting effect during acute ethanol administration. During chronic alcohol consumption the increase of oxidative stress might play a major role in the initial damages of neurons, which is further complicated with malnutrition and vitamin deficiency and by the effect of damage of other organs (ie. liver). Hsp27 was shown to protect cells against oxidative stress by decreasing the level of ROS. Our results show that Hsp27 can protect neuronal cells against degradation after long-term ethanol consumption, probably through its anti-apoptotic and oxidative stress-attenuating properties.

In the earliest clinical phase of AD, patients produce a remarkable impairment of short-term-memory. Several studies have shown that soluble oligomers of A β were able to inhibit long-term potentiation (LTP) and cause learning and memory deficit. In our study we found that spatial learning and LTP was impaired and synaptic excitability was also increased in AD model mice but these symptoms were normalized by Hsp27. We also found a significantly lower level of β -amyloid deposition in the brain of APPswe/PS1dE9/Hsp27 animals compared to the APPswe/PS1dE9 group. However, it is not clear that this reduced number of plaques is the result of an enhanced A β -clearance or lower level of A β production, aggregation or plaque-deposition in the Hsp27 overexpressing AD model mice. The exact molecular mechanisms of A β induced neurotoxicity is not fully known. Several evidences are

available suggesting that A β can interact with artificial and biological membranes altering its fluidity. Since A β peptides perturb cell membrane fluidity, the cell membrane may be the location where the neurotoxic cascade of A β is initiated. We can suppose that Hsp27 can interact with and stabilize cellular membranes, thereby it can diminish the level of A β induced neurotoxic cascade or moreover the production of A β . The generation of reactive oxygen species (ROS) is also a crucial factor in the molecular mechanisms of A β -induced neurotoxicity. As several studies have shown that Hsp27 has a protective effect in oxidative stress, we can hypothesize that Hsp27 might eliminate the neurotoxicity of A β , at least in part, due to this property.

KÖZLEMÉNYEK

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

Toth ME, Gonda S, Vigh L, Santha M. (2010) Neuroprotective effect of small heat shock protein, Hsp27, after acute and chronic alcohol administration. *Cell Stress Chaperones*. 15 (6):807-17.

Toth ME, Szegedi V, Varga E, Juhasz G, Horvath J, Borbely E, LenartN, Penke B and Santha M. (2012) Overexpression of Small Heat Shock Protein, Hsp27 ameliorates symptoms of Alzheimer's Disease. *Kézirat*

A dolgozat témájához kapcsolódó egyéb közlemény:

Wang S, **Toth ME**, Bereczki E, Santha M, Guan ZZ, Winblad B, Pei JJ. (2011) Interplay between glycogen synthase kinase-3 β and tau in the cerebellum of Hsp27 transgenic mouse. *J Neurosci Res*. 89(8):1267-75.

A dolgozat témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemény:

Csont T, Gorbe A, Bereczki E, Szunyog A, Aypar E, **Toth ME**, Varga ZV, Csonka C, Fulop F, Santha M, Ferdinandy P. (2010) Biglycan protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury: role of nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol*. 48(4):649-52.

Poszterelőadás:

Toth ME, Gonda S, Santha M. (2009) *A Hsp27 neuroprotektív szerepe akut és krónikus etanoladagolás után*. MBKE 2009. évi Vándorgyűlése, Budapest